

# **LAPORAN TAHUNAN**

## **HIBAH BERSAING**



### **KAJIAN MEKANISME KENTANG HITAM (*Coleus tuberosus*) SEBAGAI *NUTRACEUTICAL* UNTUK PENCEGAHAN PENYAKIT KANKER**

**Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun**

Tim Pengusul :

Dr. Mutiara Nugraheni, S.T.P., M.Si / NIDN 0031017705

dr. Windarwati, Sp.PK (K)., M.Sc./ NIDN 0921056601

Badraningsih Lastariwati, M.Kes / NIDN

**UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA  
NOVEMBER 2013**

Dibiayai Oleh:

DIPA Universitas Negeri Yogyakarta dengan Surat Perjanjian Penugasan dalam rangka  
Pelaksanaan Program Penelitian Hibah Bersaing Tahun Anggaran 2013  
Nomor: 447a/HB-Multitahun/UN34.21/2013 tanggal 13 Mei 2013

#### HALAMAN PENGESAHAN

**Judul Kegiatan** : Kajian Mekanisme kentang Hitam (*Coleus tuberosus*) sebagai nutraceutical untuk pencegahan penyakit kanker

**Peneliti / Pelaksana**

Nama Lengkap : Dr. MUTIARA NUGRAHENI S.T.P., M.Si.

NIDN : 0031017705

Jabatan Fungsional :

Program Studi : Pendidikan Tata Busana

Nomor HP : 081578740391

Surel (e-mail) : mutiara\_nugraheni@yahoo.com

**Anggota Peneliti (1)**

Nama Lengkap : BADRANINGSIH LASTARIWATI M.Kes.

NIDN : 0025066008

Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA

**Institusi Mitra (jika ada)**

Nama Institusi Mitra :

Alamat :

Penanggung Jawab :

**Tahun Pelaksanaan** : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun

**Biaya Tahun Berjalan** : Rp. 69.983.500,00

**Biaya Keseluruhan** : Rp. 139.518.500,00

Mengetahui  
Dekan Fakultas Teknik

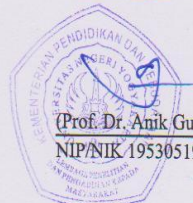


(Dr. M. Bruti Triyono)  
NIP/NIK 195408101978031001

Yogyakarta, 27 - 11 - 2013,  
Ketua Peneliti,

(Dr. MUTIARA NUGRAHENI S.T.P., M.Si.)  
NIP/NIK 19770131 2002122001

Menyetujui,  
Ketua lembaga Penelitian UNY



(Prof. Dr. Anik Gufron)  
NIP/NIK 195305191978111 001

## KAJIAN MEKANISME KENTANG HITAM (*Coleus tuberosus*)

### SEBAGAI *NUTRACEUTICAL*

### UNTUK PENCEGAHAN PENYAKIT KANKER

#### RINGKASAN

Penelitian hibah bersaing ini dilaksanakan selama dua (2) tahun dengan tujuan untuk mempelajari potensi kentang hitam dan mekanismenya sebagai *nutraceutical* berbasis bahan nabati dalam pengembangannya sebagai pencegah penyakit kanker. Langkah-langkah yang dilakukan dalam penelitian hibah bersaing ini ditujukan untuk pencapaian tujuan khusus adalah ***tahun pertama***; (1) mengetahui selektivitas antiproliferasi *in vitro* ekstrak daging dan kulit kentang hitam terhadap sel kanker HeLa dan T47D; (2) mengetahui kemampuan ekstrak daging dan kulit kentang hitam dalam menginduksi apoptosis sel kanker T47D dan HeLa dan (3) mengetahui kemampuan ekstrak daging dan kulit kentang hitam dalam menginduksi *cell cycle arrest* pada sel kanker T47D dan HeLa.

Pencapaian tersebut dilakukan secara bertahap yaitu ***Tahun pertama***: metode yang digunakan untuk pencapaian tiga tujuan khusus tersebut adalah (1) Pengujian antiproliferasi dilakukan dengan metode MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide); (2) pengujian induksi apoptosis dengan pengecatan DNA dengan acridine orange–ethidium bromide; (3) pengujian cell cycle arrest menggunakan flow cytometer untuk cell cycle arrest dengan program cell quest.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa; (1) Sel HeLa lebih sensitif dibandingkan sel T47D dengan perlakuan ekstrak etanol daging dan kulit kentang hitam. Ekstrak etanol kulit kentang hitam memiliki kemampuan lebih besar dalam menghambat proliferasi sel HeLa dan T47D dibandingkan dengan ekstrak etanol daging kentang hitam. (2) Ekstrak etanol daging dan kulit kentang hitam memiliki aktivitas menginduksi apoptosis pada sel HeLa dan T47D dan Ekstrak etanol daging dan kulit kentang hitam dapat menghambat siklus sel pada S,G2-M serta menginduksi apoptosis pada sub G1 (M).

**Key word:** kentang hitam, mekanisme, *nutraceutical*, kanker

## **Kata Pengantar**

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah S.W.T yang telah memberikan rahmad-Nya sehingga kegiatan penelitian hibah bersaing dengan judul “KAJIAN MEKANISME KENTANG HITAM (*Coleus tuberosus*) SEBAGAI *NUTRACEUTICAL* UNTUK PENCEGAHAN PENYAKIT KANKER” dapat diselesaikan sesuai dengan target yang ditentukan.

Kegiatan penelitian ini dapat terlaksana karena adanya dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu ucapan terima kasih kami sampaikan kepada:

1. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Negeri Yogyakarta, yang telah memberikan sarana pendukung untuk dapat terlaksananya kegiatan ini.
2. Dekan Fakultas Teknik Universitas Negeri Yogyakarta, yang telah memberikan kesempatan kepada Tim peneliti untuk melakukan kegiatan.
3. LPPT UGM beserta teknisi dan Laboratorium Patologi Klinik UGM dan Teknisi atas bantuannya dalam penggunaan peralatan laboratorium
4. Semua pihak yang telah membantu terlaksananya kegiatan penelitian ini yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu.

Lamporan penelitian ini tentu masih banyak kekurangan, namun demikian semoga dapat digunakan untuk tambahan wawasan dan pengetahuan bagi pembaca.

Yogyakarta

Peneliti

## DAFTAR ISI

Halaman sampul .....	i
Halaman pengesahan .....	ii
Ringkasan .....	iii
Prakata .....	iv
Daftar isi .....	v
Daftar Tabel .....	vi
Daftar Gambar .....	vii
Daftar Lampiran .....	ix
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....	7
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	34
BAB IV. METODE PENELITIAN .....	43
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	45
BAB VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA .....	56
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN .....	59
DAFTAR PUSTAKA .....	60
LAMPIRAN	
Personalia tenaga penelitian (CV)	
Publikasi	

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Kandungan <i>ursolic acid</i> (UA), <i>oleanolic acid</i> (OA) dan total <i>triterpenic acid</i> (TTA) pada bagian daging dan kulit kentang hitam menggunakan berbagai jenis pelarut .....	30
Tabel 2. IC <sub>50</sub> perlakuan ekstrak etanol daging dan kulit, senyawa <i>ursolic acid</i> , <i>oleanolic acid</i> , <i>quercetin</i> , pada sel MCF 7 dengan variasi waktu 24, 48 dan 72 jam .....	30
Tabel 3. Uraian dan Hasil yang diharapkan pada penelitian Kentang Hitam .....	39
Tabel 4. IC <sub>50</sub> ekstrak etanol kulit dan daging kentang hitam pada sel T47D dan HeLa .....	45

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Kentang hitam .....	7
Gambar 2. Pembentukan radikal bebas dari dalam dan luar tubuh .....	11
Gambar 3. Peranan antioksidan dalam sel pada perlindungan tubuh akibat adanya ROS .....	12
Gambar 4. Metode dan prinsip evaluasi aktivitas antioksidan seluler .....	14
Gambar 5. Tahapan kanker .....	16
Gambar 6. Perubahan MTT menjadi formazan oleh enzim mitokondria succinate dehidrogenase .....	25
Gambar 7. Persentase penurunan reactive oxygen species (ROS) dengan perlakuan ekstrak etanol daging kentang hitam pada sel MCF-7 yang diinduksi dengan Phorbol Miristate Asetat .....	31
Gambar 8. Persentase penurunan reactive oxygen species (ROS) dengan perlakuan ekstrak etanol kulit kentang hitam pada sel MCF-7 yang diinduksi dengan PMA.....	31
Gambar 9. Roadmap penelitian kentang hitam .....	33
Gambar 10. Roadmap penelitian Kentang Hitam .....	36
Gambar 11. Roadmap penelitian Hibah Bersaing selama 2 tahun .....	37
Gambar 12. Evaluasi antiproliferasi sel T47D dan HeLa .....	41
Gambar 13. Evaluasi induksi apoptosis pada sel kanker T47D dan HeLa .....	42
Gambar 14. Evaluasi cell cycle arrest pada sel kanker T47D dan HeLa .....	43
Gambar 15. Induksi apoptosis pada sel T47D dengan ekstrak kulit kentang hitam .....	48
Gambar 16. Induksi apoptosis pada sel T47D dengan ekstrak daging kentang hitam .....	49
Gambar 17. Induksi apoptosis pada sel HeLa dengan ekstrak daging kentang hitam .....	50

Gambar 18. Induksi apoptosis pada sel HeLa dengan ekstrak daging kentang hitam .....	50
Gambar 19. Perlakuan ekstrak etanol daging kentang hitam pada sel T47D	52
Gambar 20. Perlakuan ekstrak etanol kulit kentang hitam pada sel T47D ...	52
Gambar 21. Perlakuan ekstrak etanol daging kentang hitam pada sel HeLa	53
Gambar 22. Perlakuan ekstrak etanol kulit kentang hitam pada sel HeLa ....	53
Gambar 23. Mekanisme pengujian DCF .....	57



## **DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1. Personalia Peneliti

Lampiran 2. Kontrak penelitian

## **BAB I. PENDAHULUAN**

## **BAB I. PENDAHULUAN**

### **A. LATAR BELAKANG**

Tubuh manusia setiap hari selalu terpapar dengan radikal bebas yang berasal dari luar atau dalam tubuh. Meskipun dalam tubuh terdapat sistem pertahanan antioksidan, tetapi tubuh dapat mengalami stress oksidatif apabila terjadi ketidakseimbangan antara jumlah antioksidan dan oksidan (*Reactive Oxygen Species*) (Gina *et al.*, 2009). Stres oksidatif yang terjadi dalam tubuh dapat mengakibatkan terjadinya penyakit degeneratif, diantaranya adalah kanker payudara.

Kanker merupakan penyakit yang disebabkan terganggunya kontrol regulasi pertumbuhan sel normal (Balasubramanian, 2007). Berdasarkan World Cancer Research Fund (WCRF) dan The American Institute for Cancer Research (AICR) kasus kanker diproyeksikan meningkat dari 10,3 juta kasus pada tahun 1996 menjadi 14,7 juta tahun 2010 dan kanker payudara adalah penyebab kedua kematian wanita yang berkaitan dengan kanker dan setengah dari penderita kanker payudara meninggal akibat penyakit ini, kecuali ada deteksi dan perlakuan dini. (Michael M. Opta & Ernest B. Izevbigie, 2006). Menurut WHO 8-9% wanita akan mengalami kanker payudara. Ini menjadikan kanker payudara sebagai jenis kanker yang paling banyak ditemui pada wanita. Berdasar data Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) 2007, kejadian kanker payudara sebanyak 8.227 kasus atau 16,85 persen dan kanker leher rahim 5.786 kasus atau 11,78 persen. Hal ini menunjukkan Kanker payudara masih mendominasi di Indonesia.

Di dunia, setiap 2 menit, seorang wanita meninggal akibat kanker serviks, di Indonesia, setiap 1 jam (Ferlay J *et al.* Globocan 2002. IARC 2004). Sementara ketidaktahuan para wanita akan ancaman kanker serviks juga turut membantu banyaknya wanita yang meninggal akibat penyakit ini. Menurut survei yang melibatkan 5.423 wanita Asia dan dilakukan pada 9 negara, termasuk Indonesia, terbukti hanya 2 persen wanita yang mengetahui bahwa infeksi HPV merupakan penyebab kanker serviks. Jadi pengetahuan perempuan mengenai penyebab kanker serviks masih sangat minim. Kanker tersering di Indonesia (34,4% dari

seluruh kanker pada perempuan)<sup>1</sup>. Hampir 70%nya diketahui sudah pada stadium lanjut (> stage IIB)<sup>2</sup>. 15.000 kasus baru, 8.000 kematian<sup>3</sup>. Setiap hari ditemukan 40-45 kasus baru, dengan 20-25 orang meninggal dunia. Yayasan Kanker Indonesia memaparkan, angka kematian kanker serviks terbanyak di antara jenis kanker lain di kalangan perempuan. Diperkirakan, 52 juta perempuan Indonesia berisiko terkena kanker serviks, sementara 36 persen perempuan dari seluruh penderita kanker adalah pasien kanker serviks. Ada 15.000 kasus baru per tahun dengan kematian 8.000 orang per tahun. Angka harapan hidup lima tahun jika kanker ini diketahui dan diobati pada stadium 1 adalah 70-75 persen, pada stadium 2 adalah 60 persen, pada stadium 3 tinggal 25 persen, dan pada stadium empat penderita sulit diharapkan bertahan.

Berdasarkan penelitian 30-40% dari semua kasus kanker dapat dicegah dengan diet. Berdasarkan hal tersebut konsep pencegahan kanker dengan memasukkan makanan yang mengandung senyawa bioaktif pencegah kanker dan berfungsi sebagai antioksidan perlu dilakukan. Salah satu tanaman yang menunjukkan potensi antitumor adalah kentang hitam. Penelitian Yap Wie Hsum et al (2008) menunjukkan ekstrak kloroform kentang hitam memiliki potensi antitumor pada tahapan promosi Raji sel, analisis GC-MS menunjukkan adanya senyawa *triterpenic acid*. Menurut Min Yang (2007) dan Yosra et al, (2010), manfaat senyawa pada golongan triterpenoid adalah antioksidan dan antitumor.

Nugraheni *et al.*, (2011) membuktikan bahwa ekstrak etanol kentang hitam mengandung senyawa triterpenic acid yaitu ursolic acid dan oleanolic acid. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ursolic acid dan oleanolic acid memiliki kemampuan sebagai antioksidan dan anti kanker (Shan *et al.* (2009); Yan-Xia *et al.* (2010); ; Jie Lie *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007; Shyu *et al.*, 2010). Nugraheni et al (2011) menunjukkan bahwa ekstrak kulit dan daging kentang hitam memiliki kemampuan dalam mencegah proliferasi dan memiliki kemampuan sebagai mereduksi stress oksidatif pada sel kanker payudara.

Penelitian lanjutan mengenai selektivitas antiproliferasi ekstrak kentang hitam pada bagian kulit dan daging terhadap sel kanker yang lain perlu dilakukan. Selain itu juga diperlukan penelitian mengenai mekanisme penghambatan

proliferasi sel kanker, sehingga penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan dalam menggunakan ekstrak kentang hitam sebagai nutraceutical untuk pencegahan penyakit kanker.

Kentang hitam dalam penelitian Nugraheni *et al.* (2011) menunjukkan kemampuannya sebagai antioksidan pada sel kanker MCF-7. Namun demikian diperlukan penelitian lanjutan mengenai kemampuan ekstrak kentang hitam dalam mereduksi terjadinya stress oksidatif pada sel kanker T47D dan HeLa yang diinduksi dengan radikal bebas (phorbol miristate acetate) dan mekanismenya dalam mempengaruhi antioxidant defense system. Sehingga dengan penelitian ini diharapkan diperoleh informasi mengenai kemampuan dan mekanisme ekstrak kentang hitam dalam mereduksi stress oksidatif sehingga menginduksi penghambatan proliferasi sel kanker.

Penelitian selama dua tahun ini diharapkan dapat menjelaskan keterkaitan antara kemampuan ekstrak kentang hitam dalam menghambat proliferasi sel kanker dan kemampuan sebagai antioksidan di tingkat seluler sel kanker. Sehingga informasi ini dapat dijadikan acuan untuk pengembangan kentang hitam sebagai nutraceutical pencegahan penyakit degenerative khususnya penyakit kanker.

## **B. Urgensi (Keutamaan) Penelitian**

Penelitian tentang kentang hitam selama ini lebih banyak diarahkan pada perkembangbiakannya, sedangkan potensi sebagai sumber sayuran berbentuk umbi yang mengandung senyawa bioaktif dan dapat dimanfaatkan sebagai makanan fungsional belum banyak dilakukan. Masyarakat Indonesia sudah sejak lama mengkonsumsi kentang hitam baik dalam kehidupan sehari-hari ataupun dalam acara adat tertentu (tingkepan, tujuh bulanan). Namun demikian penggunaan dan pengolahannya masih terbatas yaitu direbus dan disayur. Keterbatasan informasi tentang senyawa bioaktif yang dapat digunakan untuk menjaga kesehatan mengakibatkan pemasarannya kurang luas dan menjadikan kentang hitam ini tersingkir dari pasaran.

Kentang hitam yang termasuk dalam golongan sayuran yang berbentuk umbi memiliki arti strategis dalam mendukung program ketahanan pangan, karena potensinya sebagai sumber karbohidrat dan kandungan gizi yang lain serta dikembangkan oleh petani lokal, pengolahannya mudah, dan harganya relatif murah. Lebih dari itu, apabila dirunut dari pengelompokan yaitu Famili: *Lamiaceae* dan sub famili : *Nepetoideae*, maka tanaman yang termasuk dalam golongan tersebut dimungkinkan mengandung senyawa triterpenic acid yaitu Oleanolic acid dan Ursolic acid (Mathe Imre, 2008; Gabor Janicsak et al, 2006; Du and Chen, 2009; Kossiar-Wojciak, 2007; Gohari et al, 2009). Penelitian Nugraheni et al (2011) membuktikan bahwa kentang hitam mengandung ursolic acid dan oleanolic acid.

Penelitian pada beberapa dekade menunjukkan bahwa beberapa mikronutrien pada buah-buahan dan sayuran dapat mengurangi kanker dan menurunkan resiko penyakit diabetes mellitus. Komponen aktif pada fitokimia diet yang sering muncul untuk melindungi kanker adalah curcumin, genistein, resveratrol, diallyl sulfide, lycopene, capsaicin, ellagic acid, *ursolic acid*, *oleanolic acid*, isoflavon, folic acid, beta-karoten, vitamin D, selenium, vitamin E, flavonoids dan dietary fiber. Agen (senyawa) ini dapat digunakan untuk menekan proses inflamasi yang menjadikan pada transformasi, hyperproliferasi dan inisiasi karsinogenesis (Bharat B. Aggarwal and Shishir Shishodia, 2006).

Manfaat senyawa yang termasuk golongan Triterpenoids adalah antioksidan dan antitumor ( Min Yang, 2007; Hyungeun Yoon et al, 2008; Ju-Hong Feng et al, 2009). Hal tersebut selaras dengan penelitian Mooi, et al (2002) melaporkan bahwa ekstrak ethanol dari umbi *Coleus tuberosus* (kentang hitam) memiliki aktivitas antitumor pada Raji sel yang ditunjukkan dengan kemampuan dalam menghambat aktivasi Eipstein Barr Virus (EBV) secara *in vitro*. Yap Whei Sum et al, (2008) yang mengatakan bahwa ekstrak umbi kentang hitam (*Coleus tuberosus*) yang menggunakan pelarut kloroform memiliki senyawa potensial sebagai antitumor pada Raji sel yang ditunjukkan dengan kemampuan dalam menghambat aktivasi Eipstein Barr Virus (EBV), tidak toksik dan dapat mempertahankan viabilitas sel sebesar 80%.

Nugraheni et al (2011) membuktikan bahwa ekstrak daging dan kulit kentang hitam memiliki kemampuan sebagai antiproliferasi dan mereduksi stress oksidatif pada sel kanker payudara MCF-7, namun demikian penelitian selektivitas ekstrak etanol bagian daging dan kulit terhadap beberapa sel kanker belum dilakukan. Sehingga **diperlukan penelitian lanjutan untuk mengetahui selektivitas ekstrak daging dan kulit kentang hitam serta mekanisme penghambatan proliferasi terhadap beberapa sel kanker yaitu HeLa dan T47D.** Sehingga diperoleh informasi yang lebih lengkap mengenai potensi ekstrak kentang hitam baik bagian kulit dan daging sebagai antiproliferasi sel kanker. Hasil ini **akan menjadi acuan untuk pengembangan ekstrak kentang hitam sebagai *nutraceutical* yang dapat mencegah penyakit degenerative terutama pencegahan penyakit kanker.**

Evaluasi aktivitas antioksidan seluler diperlukan untuk mengetahui kemampuan ekstrak daging dan kulit kentang hitam dalam menangkap radikal bebas yang menyebabkan terjadinya penyakit degenerative seperti kanker. Aktivitas antioksidan seluler pada penelitian ini menggunakan sel kanker T47D dan sel kanker HeLa. Penggunaan sel kanker yang merupakan sistem biologis **diharapkan dapat lebih menggambarkan kompleksitas yang terjadi dalam tubuh manusia.** Sehingga **keutamaan dan kebaharuan penelitian ini adalah aplikasi ekstrak daging dan kulit kentang hitam pada sel T47D dan sel HeLa dalam kaitannya dengan aktivitas antioksidan seluler, serta mekanisme pereduksi stress oksidatif dalam kaitannya dengan aktivitas antioksidan enzim catalase dan SOD, dimana belum ada penelitian dan publikasi mengenai hal tersebut.**

Penggunaan sel kanker T47D, sel kanker HeLa dan sel vero diharapkan lebih dapat menggambarkan kompleksitas sistem biologi dan merupakan alat yang penting untuk memeriksa makanan, fitokimia dan suplemen makanan yang potensial untuk aktivitas biologi, karena model aktivitas antioksidan seluler ini mempertimbangkan pengambilan senyawa oleh sel, distribusi dan efisiensi perlindungan terhadap radikal bebas dibawah kondisi fisiologis tubuh.

Penelitian sebelumnya telah dilakukan identifikasi senyawa triterpenic acid yaitu oleanolic acid dan ursolic acid (Nugraheni et al., 2011). Jenis senyawa tersebut memiliki beberapa sifat fungsional yang cukup luas: hepatoprotectif, hipoglikemik, anti-hiperlipidemik, antihipertenssif, **anti kanker**. (Ken Yasukawa, 2009). Berdasarkan beberapa hasil penelitian tersebut, kentang hitam memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai *nutraceutical* untuk pencegahan penyakit, namun demikian untuk pengembangannya lebih lanjut diperlukan informasi yang jelas mengenai keunggulan kentang hitam terutama kaitannya dengan kemampuan antiproliferasi, antioksidatif. Sehingga **Keutamaan penelitian ini adalah diperoleh informasi potensi ekstrak kasar kentang hitam untuk bagian daging dan kulit sebagai antioksidan di tingkat seluler, mekanisme pereduksi stress oksidatif kaitannya dengan aktivitas antioksidan enzim (katalase dan SOD), dan antiproliferasi pada sel T47D dan sel HeLa berserta mekanisme penghambatan proliferasinya.**

Penelitian selama dua tahun ini diharapkan dapat memberikan informasi yang lengkap mengenai potensi ekstrak kentang hitam untuk mencegah penyakit degenerative. Hasil ini akan menjadi acuan jangka panjang untuk pengembangan ekstrak kentang hitam menjadi *nutraceutical* untuk pencegahan penyakit terutama kanker. Sehingga diharapkan kentang hitam dapat dikembangkan menjadi *nutraceutical* untuk pencegahan penyakit degenerative sehingga dapat meningkatkan derajat kesehatan masyarakat Indonesia.



## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. *State of the art* dalam bidang yang diteliti

Kentang hitam memiliki nama latin *Solenostemon rotundifolius* (Poir), *Coleus tuberosus* (Benth), *Coleus rotundifolius*, *Plectranthus parviflorus*, *Plectranthus rotundifolius*. Termasuk dalam Famili : *Lamiaceae* dan sub famili : *Nepetoideae*. Kentang hitam berasal dari Afrika yang beriklim tropis, Mali, Ghana, Nigeria dan Afrika Selatan. Namun sekarang sudah ditanam di Benua Asia yang beriklim tropis. Umbi kentang hitam ada beberapa ukuran, bentuk dan warna. Tipe dengan warna abu-abu sampai coklat kehitaman tumbuh di Mali. Sedangkan umbi dengan warna kuning sampai merah gelap tumbuh di afrika. ([www.Prota.org](http://www.Prota.org)).

Kentang hitam (*Coleus tuberosus*) termasuk dalam kelompok sayuran yang berbentuk umbi, sehingga dalam pengembangannya dilakukan oleh Departemen Pertanian terutama oleh Badan Penelitian Sayuran (Balitsa). Deskripsi kentang hitam : Kentang hitam merupakan herb, semusim tinggi 20-75 cm, batangnya tegak atau sedikit merambat, bersegi, lunak dan berwarna hijau. Daun : tunggal, berseling, tepi beringgit, ujung tumpul, panjang 2-6 cm.lebar 2-4 cm, pertulangan daun menyirip, permukaan sedikit berbulu dan berwarna hijau. Bunga : majemuk, berbentuk bulir, di ujung batang, betangkai panjang, kelopak bentuk bintang, mahkota bentuk bibir, kecil dan berwarna ungu. Buah : bulat, ditutupi selaput buah dan berwarna hijau. Biji : bulat, kecil dan berwarna hitam. Akar : Serabut membentuk umbi dan berwarna hitam.



Gambar 1. Kentang hitam

Kentang hitam (Gambar 1) merupakan tanaman pangan yang potensial sebagai sumber pangan karbohidrat alternatif dan obat-obatan. Menurut Chaterine et al (2005) menuliskan bahwa kentang hitam termasuk dalam Clade 1b yang dimanfaatkan sebagai makanan dan pengobatan. Bagian yang bermanfaat adalah umbi dan daun. Penggunaan kentang hitam saat ini masih terbatas untuk direbus, dan disayur. Kurangnya informasi mengenai keunggulan yang dimiliki kentang hitam menyebabkan kurang luasnya pemasaran sehingga menjadikannya tersingkir dari pasaran.

Kentang hitam (*coleus tuberosus*) merupakan tanaman pangan potensial sebagai sumber pangan karbohidrat alternatif dan obat-obatan, penyakit maag. Kentang hitam termasuk dalam family Lamiaceae, dimana famili Lamiaceae juga dikenal dengan family Labiate atau family mint. Family ini terdiri dari 6500 spesies. Beberapa metabolit sekunder adalah bermacam-macam terpenoids terutama, mono-, sesqui-, di- dan tri-terpenes. (Luisa Pistelli, 2006). Distribusi senyawa bioaktif dalam sub family Nepetodeae cenderung lebih besar daripada sub family lamioideae seperti diterpene, triterpenic acid (ursolic acid dan oleanolic acid), betalains, glicosida. (Mathe Imre, 2008).

**Upaya mendorong masyarakat dalam mengembangkan produksi dan konsumsi kentang hitam sebagai nutraceutical dan bahan pangan lokal, harus disertai dengan informasi yang jelas mengenai keunggulan yang dimiliki kentang hitam dalam kaitannya dengan pencegahan penyakit terutama penyakit kanker.**

**Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak kentang hitam memiliki kemampuan sebagai antioksidan dan antiproliferasi pada sel kanker MCF-7 (Nugraheni et al., 2011a,b). Namun demikian selektivitas dan mekanisme anti-proliferasi ekstrak kentang hitam terhadap sel kanker (T47D dan HeLa) belum diketahui. Demikian pula mekanisme ekstrak kentang hitam sebagai antioksidan dan mekanismenya dalam mereduksi stress oksidatif belum diketahui. Penelitian ini diperlukan untuk pengembangan ekstrak kentang hitam sebagai *nutraceutical* pencegah penyakit kanker.**

## ***B. Nutraceutical***

*Nutraceutical* pertama kali didefinisikan pada tahun 1989 oleh Stephen De Felice “ sebagai makanan, ingredient makanan atau suplemen makanan yang memberikan keuntungan pada kesehatan termasuk diantaranya mencegah dan memanage penyakit diluar fungsi nutrisi dasar”. *Nutraceutical* adalah senyawa bioaktif alami. *Nutraceutical* terdapat pada produk-produk alami dari (a) industri makanan; (b) suplemen makanan dan herbal; (3) industri farmasi. Senyawa-senyawa bioaktif misalkan terpenoid, karotenoid, saponin, terpen, tokoferol, senyawa phenol, turunan karbohidrat, lemak dan asam amino, mikrobial dan mineral termasuk dalam *nutraceutical*. *Nutraceutical* dapat melindungi dan mencegah kanker pada tubuh manusia melalui beberapa mekanisme penghambatan dalam tubuh ((Sharma, 2009).

*Nutraceutical* merupakan istilah yang relatif baru, diciptakan tahun 1989 oleh Dr. Stephen L. DeFelice, ketua Foundation of Innovation Medicine (FIM) di Crawford, New Jersey, Amerika Serikat. Istilah itu merupakan paduan kata *nutrition* dan *pharmaceutical* yang diartikan sebagai pangan atau produk pangan yang memberi manfaat kesehatan dan medis, termasuk pencegahan dan pengobatan penyakit. *Health Canada* telah memodifikasi definisi *nutraceutical* menjadi: “*Produk yang dipisahkan atau dimurnikan dari makanan yang umumnya dijual dalam bentuk obat yang tidak dimaksudkan sebagai makanan. Nutraceutical dinyatakan memiliki manfaat fisiologis atau memberi perlindungan terhadap penyakit kronis.*”

Pencegahan senyawa bioaktif yang termasuk dalam *nutraceutical* yang dapat mencegah kanker sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya. Rackley *et al.* (2006) menunjukkan bahwa isoflavon dari kedelai dapat mencegah atau manajemen kanker tulang. Senyawa flavonoid dapat mencegah terjadinya kanker hati. *Nutraceutical* juga dapat mencegah dan memanage penyakit diabetes dan kanker yang lain (Burns, 2010); Pandey *et al.*, 2011).

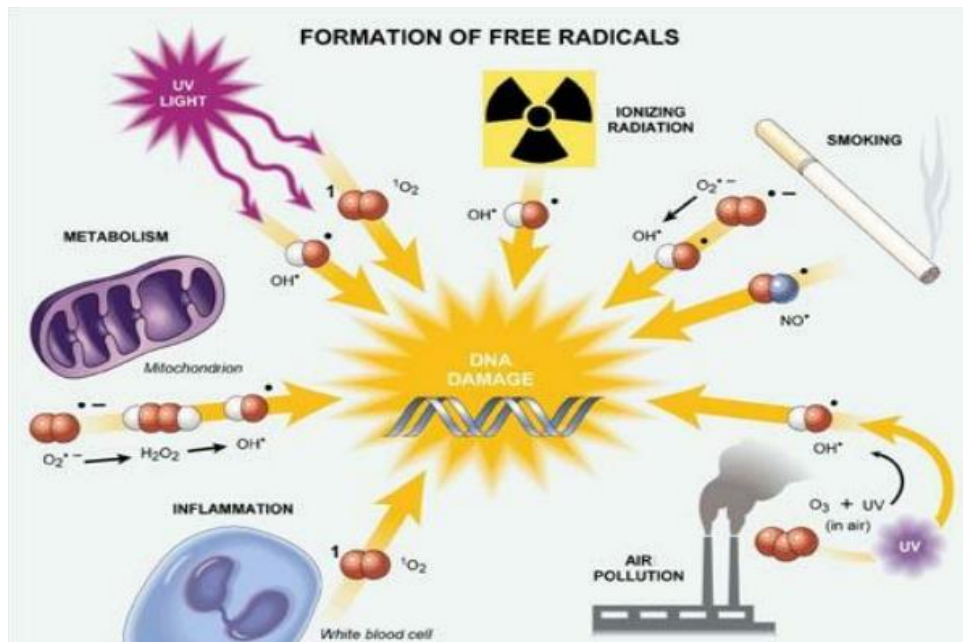
Beberapa *nutraceutical* menunjukkan kemampuannya dalam mencegah penyakit kanker dengan beberapa mekanisme aksi kemopreventif dalam tubuh.

Senyawa yang bertindak sebagai antioksidan dapat mencegah kanker dengan menangkap radikal bebas, menginduksi apoptosis, menghambat proliferasi sel kanker, menginduksi cell cycle arrest, mempengaruhi system sinyal dalam sel, mempengaruhi aktivitas antioksidan enzim (superoksida dismutase) (Sharma, 2009).

### C. Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya dengan cuma-cuma kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu sama sekali dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas. Sumber radikal bebas (*Reactive Species Oxygen*) bisa berasal dari dalam tubuh (metabolisme tubuh) ataupun dari luar (lingkungan), misalnya : polusi, rokok, radiasi. Sumber radikal bebas terdapat pada Gambar 2.

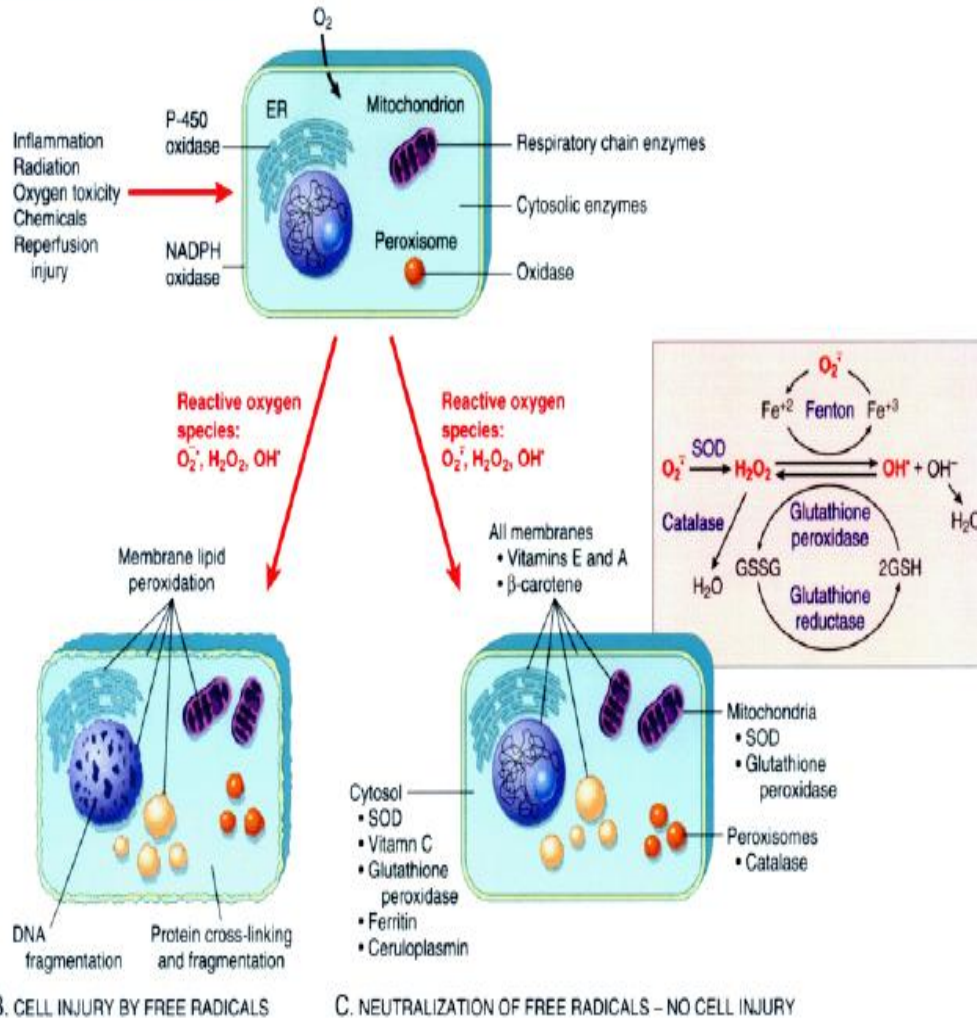
Lien Ai Pham-Huy et al (2008) mengklasifikasikan antioksidan menjadi dua yaitu antioksidan endogenus dan antioksidan eksogenus (disuplai melalui makanan). Antioksidan yang termasuk dalam endogenus dapat diklasifikasikan menjadi enzim antioksidan dan non enzim antioksidan. Enzim antioksidan yang secara langsung menetralkan ROS adalah superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) dan Glutathione reductase (GRx). SOD adalah antioksidan pertama yang menahan adanya radikal bebas, catalase mengubah superoxide anion radical ( $O_2^{\bullet-}$ ) menjadi hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) dengan reduksi. Bentuk oksidan  $H_2O_2$  diubah menjadi air dan oksigen oleh catalase (CAT) atau glutathione peroxidase (GPx). Peranan enzim antioksidan dalam melindungi tubuh akibat adanya ROS terdapat pada Gambar 3.



Gambar 2. Pembentukan radikal bebas dari dalam dan luar tubuh

Non enzim antioksidan juga dibagi menjadi dua yaitu antioksidan dari metabolisme tubuh dan antioksidan dari makanan. Antioksidan dari metabolisme tubuh termasuk dalam antioksidan endogenus, diproduksi oleh metabolisme dalam tubuh seperti lipoic acid, glutathione, L-arginine, coenzyme Q10, melatonin, uric acid, bilirubin, protein mengkelat logam dan transferin. Sedangkan antioksidan yang berasal dari luar tubuh adalah senyawa yang tidak dapat diproduksi dalam tubuh dan harus ada dalam makanan atau suplemen seperti vitamin E, vitamin C, carotenoid, selenium, flavonoid, dan senyawa bioaktif yang lain.

### A. FREE RADICAL GENERATION

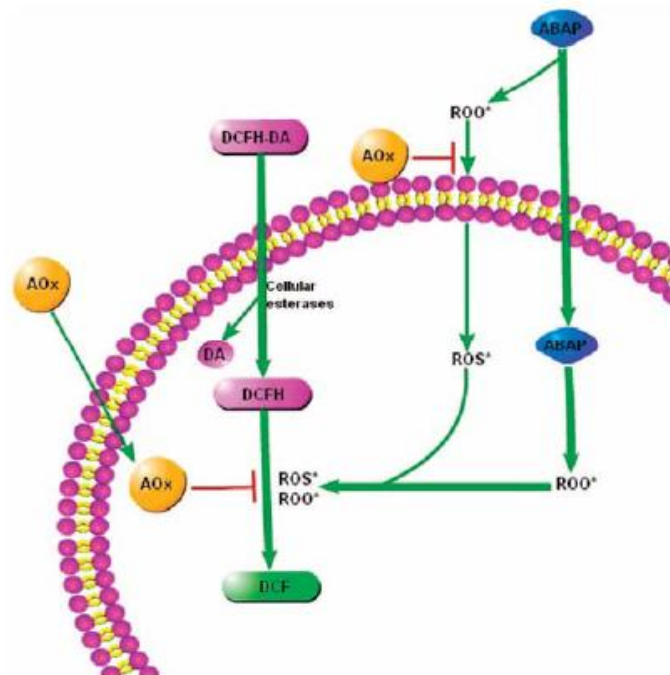


Gambar 3. Peranan antioksidan dalam sel pada perlindungan tubuh akibat adanya ROS

Tanaman baik buah-buahan maupun sayuran memiliki berbagai macam senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan alami. Beberapa metode dikembangkan untuk mengetahui kualitas dan kuantitas dari senyawa-senyawa tersebut. Pengujian aktivitas antioksidan seluler (*cellular antioxidant activity/CAA*) dilakukan dengan mengukur aktivitas antioksidan pada kultur sel (Wolfe and Liu, 2007; Wolfe *et al.*, 2008; Wolfe and Liu, 2008 and Chang *et al.*, 2001). Sel diinkubasi dengan senyawa antioksidan dan DCFH-DA (2',7'-

*dichlorofluorescein diacetate*). Antioksidan berikatan dengan membrane sel dan atau melewati membrane untuk masuk kedalam sel. DCFH-DA berdifusi ke dalam sel dimana esterase seluler melepaskan diacetate sehingga membentuk DCFH yang lebih polar. Sel yang diperlakukan dengan peroksil radikal yang dapat berdifusi kedalam sel, misalnya *2,2'-Azo-bis-amidinopropane* (ABAB),  $H_2O_2$ , *phorbol miristate acetate* (PMA) secara spontan akan terdekomposisi menjadi bentuk peroksil radikal. Peroksil radikal ini menyerang membrane sel dan menghasilkan lebih banyak radikal dan mengoksidasi DCFH intraseluler ke bentuk fluoresen DCF. Adanya antioksidan mencegah oksidasi DCFH, membrane lipida dan menurunkan pembentukan DCF ( Wolfe and Liu, 2007).

Fluoresen DCF ini dapat diukur dengan *fluorescent spectrophotometer*, mikroskop fluoresen, dan *flow cytometer*. Tingkat fluoresen diukur dan proporsional dengan tingkat oksidasi. Senyawa fitokimia murni dan ekstrak buah, sayuran dan tanaman dapat menangkap peroksil radikal dan menghambat pembentukan DCF. Aktivitas antioksidan seluler menggunakan kemampuan peroksil radikal, produk reaktif dari oksidasi lipida, untuk memicu pembentukan fluoresen oksidatif stress sebagai indikator dalam kultur sel dan mengukur pencegahan oksidasi oleh antioksidan. Perubahan DCFH-DA menjadi bentuk fluoresen (DCF) sehingga dapat ditera dengan *spectrophotometer fluoresen*, mikroskop fluoresen, dan *flow cytometer*. Seperti terdapat pada Gambar 4.



Gambar 4. Metode dan prinsip evaluasi aktivitas antioksidan seluler

Sumber : Wolfe and Liu (2007)

#### D. Kanker

Kanker merupakan suatu penyakit yang disebabkan karena terganggunya kontrol regulasi pertumbuhan sel-sel normal (Pecorino, 2008). Sel kanker memiliki perbedaan mencolok dibandingkan dengan sel-sel normal dalam tubuh:

##### 1. Memiliki sinyal pertumbuhan sendiri

Sel kanker memiliki sinyal pertumbuhan sendiri, sedangkan sel normal memerlukan sinyal eksternal untuk pertumbuhan dan pembelahannya. Proliferasi sel kanker tidak tergantung pada sinyal pertumbuhan normal. Mutasi yang dimilikinya memungkinkan sel kanker untuk memperpendek *Growth Factor pathways*.

##### 2. Tidak mengenal dan merespon sinyal penghambatan pertumbuhan

Sel kanker tidak mengenal dan tidak merespon sinyal penghambatan pertumbuhan. Keadaan ini banyak disebabkan adanya mutasi pada beberapa gen pada sel kanker. Sedangkan sel normal merespon sinyal penghambatan



pertumbuhan untuk mencapai homeostasis. Terdapat waktu tertentu bagi sel normal untuk proliferasi dan istirahat.

3. Tidak peka terhadap sinyal apoptosis

Sel kanker tidak peka terhadap sinyal apoptosis (sedangkan sel kanker membawa akumulatif DNA error yang sifatnya *irreversible*). Kegagalan sel kanker dalam merespon sinyal apoptosis lebih disebabkan karena mutasi gen-gen regulator apoptosis dan gen-gen sinyal apoptosis. Sel normal akan dikurangi jumlahnya dengan mekanisme apoptosis, bila ada kerusakan DNA yang tidak bisa lagi direparasi.

4. Potensi membelah tanpa batas

Sel kanker memiliki mekanisme tertentu untuk tetap menjaga *telomere* tetap panjang, hingga memungkinkan untuk tetap membelah diri. Kecacatan dalam regulasi pemendekan telomere inilah yang memungkinkan sel kanker memiliki unlimited replicative potential. Sel normal mengenal dan mampu menghentikan pembelahan selnya bila sudah mencapai jumlah tertentu dan mencapai pendewasaan. Penghitungan jumlah sel ini ditentukan oleh pemendekan *telomere* pada kromosom yang akan berlangsung setiap ada replikasi DNA.

5. Angiogenesis (pembentukan pembuluh darah)

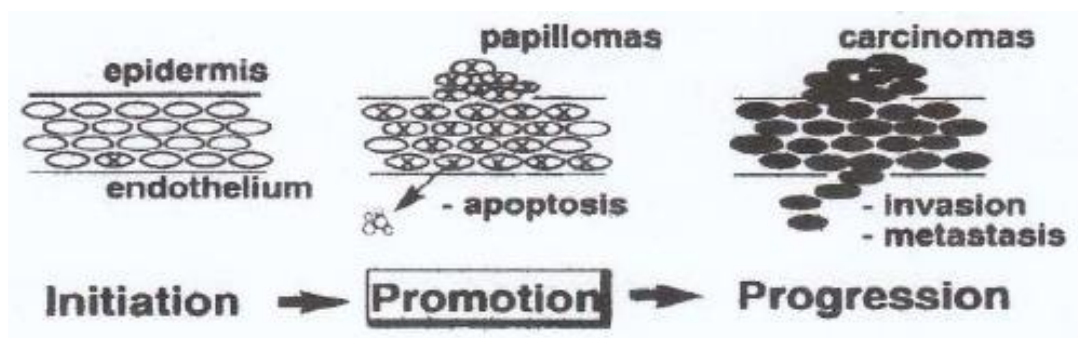
Sel kanker mampu menginduksi angiogenesis, yaitu pertumbuhan pembuluh darah baru di sekitar jaringan kanker. Pembentukan pembuluh darah baru ini diperlukan untuk survival sel kanker dan ekspansi ke bagian lain dari tubuh (metastase). Kecacatan pada pengaturan keseimbangan penginduksi angiogenik dan inhibitorynya dapat mengaktifkan *angiogenic switch*. Sel normal memiliki ketergantungan terhadap pembuluh darah untuk mendapatkan suplai oksigen dan nutrient yang diperlukan untuk hidup. Namun, arsitektur pembuluh darah sel normal lebih seherhana atau konstan sampai dengan sel itu dewasa.

6. Invasi dan metastasis.

Perpindahan sel kanker dari lokasi primernya ke lokasi sekunder atau tertier, merupakan faktor utama adanya kematian yang disebabkan karena kanker. Mutasi memungkinkan peningkatan aktivitas enzim-enzim yang terlibat invasi

sel kanker. Sel normal memiliki kepatuhan untuk tidak berpindah ke lokasi lain di dalam tubuh.

Kanker berkembang melalui serangkaian proses yang disebut karsinogenesis, sehingga kanker bukanlah penyakit langsung terjadi, melainkan penyakit yang timbul akibat akumulasi atau penumpukan kerusakan-kerusakan tertentu dalam tubuh kita. Karsinogenesis pada dasarnya dibagi menjadi tiga tahapan yaitu inisiasi, promosi dan progresi (Murakami *et al.*, 1996). Hal tersebut terdapat pada Gambar 5.



Gambar 5. Tahapan kanker

Sumber: Murakami *et al.*, 1996

**Inisiasi** terjadi pada satu atau beberapa sel. Enzim fase I seperti *cytochrome P-450 dependent monooxygenases* ini dapat mengubah prokarsinogenesis menjadi karsinogen utama. Proses aktivasi prokarsinogen oleh enzim fase I, dihambat oleh enzim fase II. Elektrofil yang diaktivasi dan tidak didetoksifikasi oleh enzim fase II dapat berinteraksi dan berikatan pada DNA selular sehingga terjadi mutasi gen. Setelah terjadi mutasi oleh sintesis replikasi DNA selular, maka proses inisiasi menjadi *irreversible* (Pitot *et al.*, 1991).

Inisiasi adalah tahapan dimana agen karsinogenik (zat yang dapat menimbulkan kanker) mulai bekerja mengubah susunan DNA fungsional atau yang lebih dikenal dengan nama gen, sehingga gen menjadi berbeda dari aslinya atau terjadi mutasi. Gen yang berubah susunannya adalah gen yang berfungsi untuk menekan pertumbuhan tumor (*tumor suppressor gene*), contoh gen p53. Agen karsinogenik banyak sekali macamnya dan secara umum sangat berkaitan dengan pola makan dan pola hidup manusia, seperti sinar UV, sinar gamma, polusi udara, asap rokok. Bahan-bahan karsinogenik tersebut akan merusak

susunan DNA yang normal dan mematikan mekanisme perbaikan DNA. *Deoxyribonucleic acid* telah dilengkapi dengan mekanisme-mekanisme tertentu yang mampu menetralkan gangguan-gangguan yang terjadi sehingga tidak membawa efek negatif. Mekanisme yang dimiliki DNA tersebut adalah mekanisme perbaikan DNA yang terjadi pada fase tertentu dalam siklus sel (Pitot *et al.*, 1991).

Fase G1 (Gap 1) terdapat *check point* yaitu suatu tempat dimana susunan DNA akan dikoreksi dengan seteliti-telitinya. Apabila ada kesalahan, sel mempunyai dua pilihan yang dapat dijalankan. Pertama, kesalahan tersebut diperbaiki dengan cara mengaktifkan *DNA repair*. Namun, apabila kesalahan yang ada sudah tidak mampu ditanggulangi, maka sel memutuskan untuk mengambil pilihan yang kedua yaitu dimatikan. Saat tersebut adalah keputusan untuk berapoptosis. Sel dengan DNA normal akan meneruskan untuk melengkapi siklus yang tersisa yaitu S (sintesis), G2 (Gap 2) dan M (Mitosis). Satu kali terjadi proses mutasi DNA belum menimbulkan kanker, sehingga masih diperlukan ribuan mutasi. Apabila mutasi DNA yang sangat banyak telah terjadi, maka sel akan berubah sifatnya perlahan-lahan, menjadi ganas dan asosial (Pitot *et al.*, 1991).

**Promosi** adalah tahap dimana sel yang memiliki gen yang mengalami mutasi mulai membelah diri (proliferasi) dan membentuk grup tertentu (klonal) di dalam tubuh. Aktifnya *Protein Kinase C* (PKC) menjadikan fosforilasi protein yang mengatur diferensiasi dan atau proliferasi. Aktivasi PKC diikuti oleh induksi dan atau aktivasi beberapa gen yang berhubungan dengan proliferasi seperti c-myc, c-fos, dan c-jun (Castagna *et al.*, 1982).

Karakteristik pada tingkatan **progresi** adalah *irreversible*. Sel yang berada pada tahapan progresi ini akan diikuti dengan proliferasi (pembelahan diri sel kanker menjadi banyak) yang kemudian satu atau lebih sel bisa memisahkan diri dari lokasi utama untuk berpindah ke tempat yang lain (metastasis). Untuk memenuhi kebutuhannya, maka terbentuk pembuluh darah baru (neoangiogenesis) yang sebenarnya tidak diperlukan oleh jaringan sehat (Pitot *et al.*, 1991).

Selama tahapan inisiasi, kerusakan DNA karena stres oksidatif memproduksi mutasi gen dan perubahan struktur DNA, yang menghasilkan mutasi yang dapat diturunkan. Tahapan promosi, ROS dan stress oksidatif dapat memberikan kontribusi pada ekspresi gen yang abnormal, menutup komunikasi antar sel dan memodifikasi sistem pengirim pesan kedua yang menghasilkan peningkatan proliferasi (perbanyakkan sel) atau penurunan pada apoptosis pada populasi inisiasi. Hasilnya adalah ekspansi klonal (grup baru). Stres oksidasi juga berperan pada tahapan progresi terjadinya kanker. Perubahan ini menghasilkan perubahan aktivitas enzim dan membuat resisten pada pengendalian pertumbuhan normal.

#### **D.1. Proliferasi dan anti-proliferasi**

Terjadinya kerusakan DNA sel normal yang terjadi pada tahapan inisiasi dapat menyebabkan sel mengalami mutasi DNA. Proliferasi sel yang mengalami mutasi DNA tersebut dapat berlanjut pada tahap promosi dan progresi sehingga dapat menimbulkan kanker. Namun demikian apoptosis dapat terjadi baik pada tahap inisiasi, promosi dan progresi sehingga dapat mencegah terjadinya perkembangan sel yang mengalami kerusakan DNA menjadi kanker.

Senyawa bioaktif memiliki aktivitas menghambat proliferasi sel yang mengalami kerusakan DNA yang berakibat pada mutasi DNA. Salah satu mekanisme penghambatan proliferasi sel yang telah mengalami mutasi DNA adalah dengan menginduksi terjadinya apoptosis pada masing-masing tahap perkembangan sel kanker. Senyawa yang dapat menghambat proliferasi sel kanker disebut memiliki kemampuan anti-proliferasi sel kanker.

Dua peristiwa penting pada perkembangan multi tahap sel kanker adalah proliferasi tidak terkendali dan apoptosis. Proliferasi tidak terkendali dan apoptosis adalah karakter kanker yang paling sering digunakan oleh para peneliti dalam memformulasikan upaya pengobatan dan pencegahan kanker. Pada kasus kanker, jumlah sel berapoptosis menjadi sangat rendah, sehingga sel kanker bersifat immortal. sedangkan proliferasi selnya meningkat sangat tinggi.

Immortalitas kanker disebabkan oleh hilangnya mekanisme perbaikan DNA dalam sel. Tidak adanya kemampuan memperbaiki DNA sebelum sel tersebut membelah, mengakibatkan sel tersebut layak untuk membelah. Mekanisme perbaikan sudah tidak ada artinya, akibatnya, sel walaupun membawa abnormalitas di dalamnya, dapat melewati fase-fase dalam siklus sel secara keseluruhan kemudian membelah.

Proliferasi pada kasus kanker meningkat sangat tajam, karena tidak adanya mekanisme *DNA repair*, sehingga proliferasi tak terkendali dan sel kanker berhasil membentuk klonal (kelompok). Ciri khas sel kanker adalah mengalami proliferasi tidak terkendali, pertumbuhan tidak terkendali dan pembelahan tanpa batas. Proliferasi dapat diartikan sebagai peningkatan jumlah sel hasil pertumbuhan dan memperbanyak diri dengan cara pembelahan yang tidak terkendali. Proliferasi sel kanker dapat terjadi, salah satunya melalui hambatan kerja p53 yang merupakan gen penekan tumor akibat adanya stres oksidatif pada sel kanker.

Fenomena menurunnya apoptosis dan proliferasi sel yang meningkat sangat tinggi, dicoba untuk diubah dengan tujuan sel kembali pada kondisi normal. Salah satu upaya yang dilakukan adalah dengan menggunakan senyawa bioaktif yang kinerjanya menghambat proliferasi sel. Senyawa yang memiliki kemampuan menghambat proliferasi sel kanker adalah senyawa yang bertindak sebagai anti-proliferasi (Moongkarndi *et al.*, 2004).

Perlakuan suatu senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas anti kanker terhadap sel kanker dapat menyebabkan perubahan pada morfologi sel tersebut. Perubahan tersebut ditandai dengan adanya *cell shrinkage* (pengkerutan sel), *membrane blebbing* (penggelembungan sel), terjadinya kondensasi kromatin pada DNA menjadi beberapa fragmen yang disebabkan oleh lepasnya DNA nukleusomal (Shaban *et al.*, 2007).

Senyawa bioaktif yang memiliki kemampuan sebagai anti-proliferasi diantaranya adalah ekstrak *Acai* yang kaya antosianin memiliki kemampuan sebagai antioksidan dan anti-proliferasi sel kanker payudara pada dosis 50, 100 dan 200 µg/ml (Hogan *et al.*, 2010). Senyawa tanaman *Tinctures* memiliki kemampuan sebagai antioksidan dan juga antiproliferatif pada sel HepG2

(Gebhardt, 2003). Spesies *sea cucumber* Malaysia memiliki aktivitas antioksidan sekaligus anti-proliferasi pada sel kanker cervik dan kanker paru-paru (Althunibat *et al.*, 2009).

Aggarwal and Shishodia, (2006) menyatakan bahwa mekanisme senyawa bioaktif dalam mencegah penyakit kanker dilakukan dengan mempengaruhi target molekuler tertentu (Gambar 9), diantaranya adalah

(1) Mengatur protein yang berperan pada siklus sel.

Meregulasi protein *cell-cycle* dengan menginduksi *cell cycle arrest*; meningkatkan ekspresi P27; meningkatkan ekspresi p21; dan menurunkan ekspresi *Cyclin D1* (Shyu *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2000). P27 adalah protein yang menghambat aktivitas cyclin D-, E- dan A dependent kinase dan menginduksi *cell-cycle arrest*. Rendahnya ekspresi P27 dapat menyebabkan pengembangan dan progresi karsinoma. P27 merupakan regulator G0/G1, sehingga meningkatnya P27 menyebabkan *cell-cycle arrest* pada fase G0/G1. P21 adalah protein yang menghambat ekspresi cyclin/CDK dan menyebabkan *cell cycle arrest*. Peningkatan p21 menyebabkan terjadinya penghambatan aktivitas CDK2 dan CDK4 sehingga terjadi *cell cycle arrest* pada sel kanker. *Cyclin D1* memainkan peranan dalam proliferasi sel melalui aktivasi cyclin-dependent kinases (CDK4). Penurunan regulasi cyclin D1 menunjukkan penghambatan terhadap proliferasi sel kanker.

(2) Menurunkan protein kinases, seperti *Protein kinase C*, IKK.

IkB kinase (IKK) memiliki peranan penting dalam meregulasi respon imun melalui Nuclear factor-κB. IKK memberikan implikasi pada beberapa penyakit, termasuk kanker. Disregulasi aktivitas IKK dapat menginduksi sel kanker tetap hidup, berproliferasi, migrasi, metastasis dan angiogenesis. Peranan IKK pada perkembangan kanker menjadikan IKK menjadi target intervensi terapi untuk mencegah kanker (Lee and Hung, 2008)

Protein kinase C (PKC) adalah kelompok serine/threonine kinases yang berperan pada komunikasi sinyal yang menyebabkan sel mengalami proliferasi dan diferensiasi. Peranan penting PKC dalam proses yang

berhubungan dengan transformasi sel kanker, karsinogenesis, menjadikan PKC sebagai target terapi anti kanker (Mackay and Twelves, 2003)

- (3) Menurunkan protein yang berperan sebagai anti-apoptosis, seperti Bcl2; Bcl-XL. Bcl-2 dan Bcl-XL adalah protein antiapoptosis. Adanya penurunan ekspresi protein tersebut mengakibatkan induksi apoptosis (Sidi *et al.*, 2006)
- (4) Meningkatkan protein apoptosis, seperti caspase 9; caspase 8; caspase 7, caspase 3.

Caspase memiliki peran penting dalam induksi, transduksi sinyal apoptosis intraseluler. Caspases, atau *cysteine-aspartic proteases* atau *cysteine-dependent aspartate-directed proteases* adalah keluarga sistein protease yang memiliki peranan penting dalam apoptosis, nekrosis dan inflamasi. Terdapat dua jenis caspase apoptosis yaitu *initiator (apical)* caspases and *effector (executioner)* caspases. Initiator caspases, Caspase 2, 8, 9 dan 10. Effector caspases, Caspase 3, 6 dan 7 (Fan *et al.*, 2005).

- (5) Menurunkan jalur faktor pertumbuhan, seperti TNF, EGF.

*Tumor necrosis factor* (TNF) adalah sitokin yang meregulasi sel imun. TNF mampu menginduksi kematian sel melalui apoptosis, menginduksi inflamasi dan menghambat tumorigenesis. Produksi TNF yang berlebihan memiliki implikasi terhadap berbagai macam penyakit seperti, Alzheimer, kanker, inflamasi (Pilati, 2008).

- (6) Menurunkan faktor transkripsi, seperti menurunkan *Nuclear Factor-kB*, *Activator Protein-1*, dan meningkatkan ekspresi p53 (Li *et al.*, 2010; Manu and Kuttan, 2008). *Nuclear factor-kB* (NF-kB) adalah jalur signal yang berperan penting pada pengendalian pertumbuhan sel, apoptosis, inflamasi. NF-kB adalah protein kunci pada jalur ini dan menjadi target terapi pada penyakit kanker. Stres oksidatif mengaktifkan aktivitas pengikatan DNA NF-kB. Senyawa bioaktif diduga dimediasi melalui penghambatan aktivitas pengikatan DNA NF-kB. Penekanan terhadap ekspresi NF-kB menyebabkan penghambatan proliferasi sel kanker. Beberapa stimuli, faktor pertumbuhan dan tekanan dari lingkungan seperti radiasi UV merupakan inducer AP-1. Aktivasi AP-1 berkaitan dengan regulasi pertumbuhan, transformasi sel, dan

inflamasi. AP-1 berimplikasi pada regulasi gen yang berkaitan pada apoptosis dan proliferasi dan juga mempromot proliferasi sel dengan mengaktifkan gen cyclin D1, dan menekan gen penekan tumor seperti p53, p21 dan p16. p53 adalah penekan tumor dan factor transkripsi. p53 adalah regulator kritis terhadap beberapa proses seluler termasuk signal transduction, respon sel terhadap kerusakan DNA, pengendalian siklus sel dan apoptosis. Regulasi p53 salah satunya adalah *cell-cycle arrest*. Peningkatan ekspresi p53 menyebabkan peningkatan p21 yang menyebabkan cell cycle arrest pada G0/G1.

- (7) Menurunkan adesi sel, seperti ICAM-1 (*Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*) adalah protein yang dikode oleh gen *ICAM*. Penurunan ICAM-1 dapat menurunkan perkembangan sel kanker (Blann *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 1998). Vascular cell adhesion protein 1 atau vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) adalah protein yang dikode oleh gen *VCAM1*. VCAM-1 berfungsi sebagai adesi molekul sel.
- (8) Menurunkan ekspresi protein yang meregulasi metastasis, seperti COX-2, iNOS (Wang *et al.*, 2005). Penghambatan aktivitas COX-2. COX-2 merupakan gen yang diregulasi oleh NF- $\kappa$ B. Ekspresi COX-2 diregulasi oleh tumor promoter, faktor pertumbuhan, mitogen. Over ekspresi COX-2 pada setiap kondisi premalignan dan malignan termasuk cancer colon, liver, pancreas, payudara, paru-paru, kulit, perut, kepala. Hal ini tergantung pada stimulus dan tipe sel, beberapa faktor transkripsi seperti AP-1, dan NF- $\kappa$ B dapat menstimulasi transkripsi COX-2 .

Mekanisme senyawa bioaktif sebagai antioksidan dalam mencegah kanker yaitu menangkap radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif; menghambat proliferasi sel; menginduksi diferensiasi sel; menghambat ekspresi onkogen yang dapat memicu terjadinya kanker; menginduksi ekspresi gen penekan tumor, seperti p53; menginduksi *cell cycle arrest* sehingga sel tidak dapat memperbanyak diri, menginduksi apoptosis, menghambat jalur sinyal; menginduksi enzim SOD, Catalase, GPX, enzim fase II; menghambat aktivasi karsinogen, Cox-2;



meningkatkan kekebalan tubuh; menghambat adesi dan invasi sel; mencegah DNA binding; mengatur metabolisme hormone steroid dan estrogen; antibakteri dan anti virus (Tabel 2) (Liu and Finley, 2005).

Pengujian kemampuan suatu senyawa ataupun ekstrak dalam hubungannya dengan anti-proliferasi, menurut Rui Hai Liu and John Finley (2005) dapat menggunakan model kultur sel, salah satunya adalah sel Michigan Cancer Foundation (MCF-7). Sel MCF-7 merupakan salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian, sebab 70% kasus kanker payudara mengekspresikan reseptor estrogen. Sel tersebut diambil dari jaringan payudara seorang wanita kaukasian berumur 69 tahun golongan darah O, dengan Rh positif, berupa sel adherent (melekat) yang dapat ditumbuhkan dalam media penumbuh. (ATCC, 2008) Sel ini memiliki karakteristik antara lain mengekspresikan reseptor estrogen (ER+), mengekspresikan reseptor estrogen alfa (ER alfa).(Rebecca et al, 2003).

sel HeLa atau HeLa cell line merupakan continuous cell line yang diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (cervix) seorang wanita penderita kanker leher rahim bernama Henrietta Lacks yang meninggal akibat kanker pada tahun 1951 (Anonim, 2006a). Kultur sel ini memiliki sifat semi melekat (Anonim, 2000) dan digunakan sebagai model sel kanker dan untuk mempelajari sinyal transduksi seluler (Anonim, 2006b). Sel HeLa ini cukup aman dan merupakan sel manusia yang umum digunakan untuk kepentingan kultur sel (LabWork, 2000).

Sel ini oleh George Gey. Sel ini diperlakukan sebagai sel kanker yang dipercaya berasal dari sel kanker leher rahim Ms.Lacks, namun klasifikasi dari sel ini masih diperdebatkan. HeLa bersifat imortal yang tidak dapat mati karena tua dan dapat membelah secara tidak terbatas selama memenuhi kondisi dasar bagi sel untuk tetap hidup masih ada. Strain-strain baru dari sel HeLa telah dikembangkan dalam berbagai macam kultur sel, tapi semua sel HeLa berasal dari keturunan yang sama. Sel HeLa telah mengalami transformasi akibat infeksi human papillomavirus 18 (HPV 18) dan berbeda dengan sel leher rahim yang normal (Anonim, 2006).

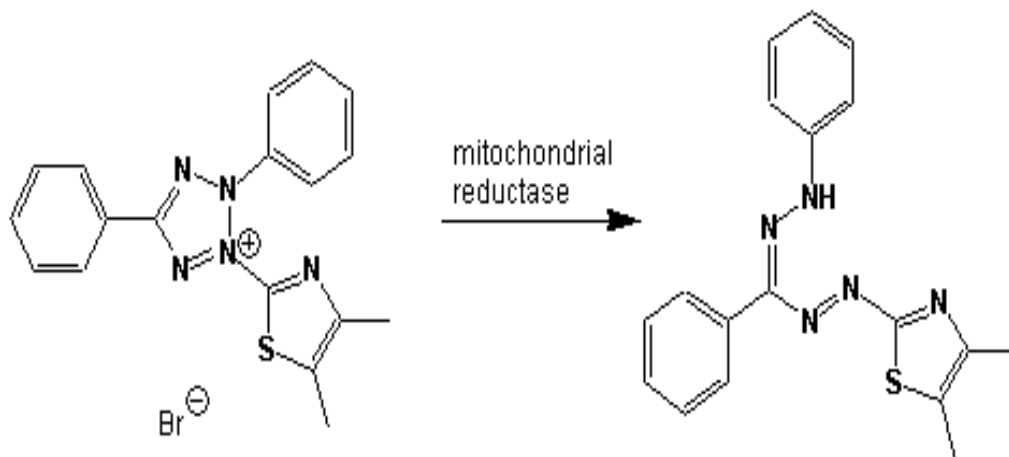
Sel HeLa dapat tumbuh dengan agresif dalam media kultur. Media yang digunakan adalah media RPMI 1640-serum. Di dalamnya terkandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan, yaitu asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Serum yang ditambahkan mengandung hormon-hormon yang mampu memacu pertumbuhan sel. Albumin berfungsi sebagai protein transport, lipid diperlukan untuk pertumbuhan sel, dan mineral berfungsi sebagai kofaktor enzim (Freshney, 1986). Sel HeLa adalah sel kanker leher rahim akibat infeksi Human Papillomavirus (HPV 18) sehingga mempunyai sifat yang berbeda dengan sel leher rahim normal. Sel kanker leher rahim yang diinfeksi HPV diketahui mengekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7. Protein E6 dan E7 terbukti dapat menyebabkan sifat imortal pada kultur primer keratinosit manusia, namun sel yang imortal ini tidak bersifat tumorigenik hingga suatu proses genetik terjadi. Jadi, viral onkogen tersebut tidak secara langsung menginduksi pembentukan tumor, tetapi menginduksi serangkaian proses yang pada akhirnya dapat menyebabkan sifat kanker (Goodwin dan DiMaio, 2000). Sebagian besar sel kanker leher rahim, termasuk sel HeLa, mempunyai gen p53 dan p105Rb dalam bentuk wild type. Jadi, gen pengatur pertumbuhan yang aktif dalam sel normal ini juga terdapat dalam sel kanker leher rahim. Namun, aktivitasnya dihambat oleh ekspresi protein E6 dan E7 dari HPV (Goodwin dan DiMaio, 2000).

Sel T47D merupakan continuous cell line yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. Continuous cell line sering dipakai dalam penelitian kanker secara in vitro karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan frozen stock jika terjadi kontaminasi (Burdall et al., 2003). Sel T47D memiliki morfologi seperti sel epitel. Sel ini dikulturkan dalam media DMEM + 10% FBS + 2 mM L-Glutamin, diinkubasi dalam CO2 inkubator 5% dan suhu 37°C (Abcam, 2007).

Sel kanker payudara T47D mengekspresikan protein p53 yang termutasi. Missense mutation terjadi pada residu 194 (dalam zinc-binding domain, L2), sehingga p53 tidak dapat berikatan dengan response element pada DNA. Hal ini mengakibatkan berkurang bahkan hilangnya kemampuan p53 untuk regulasi cell

cycle. Sel T47D merupakan sel kanker payudara ER/PR-positif (Schafer et al., 2000). Induksi estrogen eksogen mengakibatkan peningkatan proliferasinya (Verma et al., 1998). Sel T47D merupakan sel yang sensitif terhadap doksorubisin (Zampieri et al., 2002).

Evaluasi antiproliferasi dilakukan dengan metode MTT. Beberapa jenis metode untuk memprediksi karsinogenitas dilakukan secara in vitro. Prinsipnya adalah mereaksikan senyawa bioaktif dengan sel kanker yang menjadi sel uji coba. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay digunakan untuk mengevaluasi aktivitas anti-proliferasi ekstrak yang diuji dengan sel kanker. Pengujian didasarkan pada tetrazolium salt (MTT) menjadi formazan biru oleh enzim mitokondria succinate dehydrogenase (Gambar 6). Konversi hanya terdapat pada sel yang masih hidup dan jumlah formazan diproduksi secara proporsional pada jumlah sel hidup yang ada. Sehingga MTT assay potensial digunakan untuk menguji aktivitas anti-proliferasi dari ekstrak bahan (Althunibat, 2009).



Gambar 6. Perubahan MTT menjadi formazan oleh enzim mitokondria succinate dehidrogenase

## D.2. Apoptosis

Apoptosis adalah suatu proses kematian sel yang terprogram, diatur secara genetik, bersifat aktif, ditandai dengan adanya kondensasi kromatin, fragmentasi sel dan fagositosis sel tersebut oleh sel fagositik atau oleh makrofag. Apoptosis

adalah kematian sel terprogram yang merupakan proses penting dalam pengaturan homeostasis normal, proses ini menghasilkan keseimbangan dalam jumlah sel jaringan tertentu melalui eliminasi sel yang rusak dan proliferasi fisiologis dan dengan demikian memelihara agar fungsi jaringan normal (D'amico *et al.*, 1994).

Penelitian Rodriguez and Schaper (2005) menunjukkan bahwa sel yang mengalami apoptosis dapat diketahui pada perubahan morfologi sel yaitu:

1. Pengerutan sel

Sel berukuran lebih kecil, sitoplasma padat, meskipun *organella* masih normal tetapi tampak padat.

2. Kondensasi kromatin

Kondensasi kromatin merupakan gambaran apoptosis yang paling khas. Kromatin mengalami agregasi di perifer dibawah selaput dinding inti menjadi massa padat yang terbatas dalam berbagai bentuk dan ukuran. Inti sel dapat pecah membentuk dua fragmen atau lebih.

3. Pembentukan tonjolan sitoplasma dan apoptosis

Sel apoptosis mula-mula menunjukkan "*blebbing*" permukaan yang luas kemudian mengalami fragmentasi menjadi sejumlah badan apoptosis yang berikatan dengan membrane yang disusun oleh sitoplasma dan organelle padat atau tanpa fragmen inti.

4. Fagositosis badan apoptosis

Badan apoptosis ini akan difagositosis oleh sel-sel fagositik neutrofil atau makrofag. Badan apoptosis dapat didegradasi di dalam lisosom dan sel-sel yang berdekatan bermigrasi atau berproliferasi untuk menggantikan ruangan sebelumnya diisi oleh sel apoptosis yang hilang.

Proses apoptosis dikendalikan oleh berbagai tingkat sinyal sel, yang dapat berasal dari pencetus ekstrinsik maupun intrinsik. Yang termasuk pada sinyal ekstrinsik antara lain hormon, faktor pertumbuhan, *nitric oxide* dan *cytokine*. Semua sinyal tersebut harus dapat menembus membrane plasma ataupun transduksi untuk dapat menimbulkan respon. Dereglasi apoptosis mengakibatkan keadaan patologis, termasuk terjadinya proliferasi sel secara tidak terkontrol seperti terjadinya penyakit kanker. Pengendalian apoptosis dikaitkan dengan gen

yang mengatur berlangsungnya siklus sel, diantaranya gen p53, Rb, Myc, E1A, Bcl-2, BclXL, *Nuclear factor-kB*, mengaktifkan caspase, *activator protein* (AP-1), *apoptosis inducing factor* (AIF). Gangguan regulasi dan proliferasi sel, baik akibat aktivitas onkogen dominan maupun inaktivasi gen yang menekan tumor, ada hubungannya dengan pengendalian terhadap apoptosis (Martin, 2006).

#### **D.2.1. *Reactive oxygen species* dan apoptosis**

ROS dapat mempengaruhi sel proliferasi atau kematian sel (apoptosis) tergantung pada intensitas/lokasi terjadinya oksidasi dan aktivitas system antioksidan. ROS dapat menginduksi terjadinya apoptosis melalui jalur mitokondria dan non mitokondria. Melalui jalur mitokondria, penurunan jumlah ROS dalam sel dapat menginduksi apoptosis melalui jalur mitokondria dengan meningkatkan tumor suppressor p53 dan gen pro-apoptosis (Bcl2-Bcl-xl) serta p21 (Manda et al., 2009).

Penurunan jumlah ROS dalam sel dapat memberikan pengaruh pada ekspresi *Nuclear Factor-kB*. *Nuclear factor-kB* (NF-kB) adalah jalur signal yang berperan penting pada pengendalian pertumbuhan sel, apoptosis, inflamasi. Ekspresi NF-kB diinduksi oleh ROS, sehingga penurunan ROS dapat menyebabkan penurunan NF-kB yang berdampak pada induksi apoptosis dengan mempengaruhi ekspresi cyclin D1, gen penekan tumor seperti Bcl-2 dan bcl-XL.

#### **D.2.2. Antioksidan dan apoptosis**

Antioksidan berperan penting dalam terjadinya apoptosis. Antioksidan dapat menginduksi apoptosis melalui peningkatan sistem antioksidan enzim dalam sel yang berdampak pada penurunan ekspresi NF-kB. Peningkatan sistem antioksidan enzim dilakukan dengan meningkatkan ekspresi Nrf2-ARE ( *Nuclear factor E2-related protein2- Antioxidant related element*) yang merupakan gen yang mengkode enzim cytoprotective yaitu enzim detoksifikasi (SOD, CAT, GPx) (Zhao et al., 2010). Peningkatan sistem pertahanan antioksidan dalam tubuh dapat menurunkan ROS dalam sel sehingga menurunkan ekspresi NF-kB yang berperan penting pada induksi apoptosis.

Antioksidan dapat mencegah kerusakan membrane sel akibat ROS dengan menjaga permeabilitas dan fluiditas membrane (Hendrich, 2006; Tsuchiya, 2010;

Godevac *et al.*, 2008). Kemampuan antioksidan dalam menjaga permeabilitas dan fluiditas membrane, membawa pengaruh positif yaitu sistem sinyal pada sel tetap dapat berjalan, termasuk diantaranya adalah mekanisme sinyal yang berkaitan dengan apoptosis, diantaranya adalah protein pro-apoptosis (Bcl-2 dan Bcl-xl), cyclin D1, gen penekan tumor (p53, p21, dan p27) (Prades *et al.*, 2011).

Perlakuan dengan antioksidan dapat meningkatkan ekspresi protein pro-apoptosis (Bcl2 dan Bcl-3) sehingga menginduksi terjadinya apoptosis. Antioksidan juga dapat meningkatkan ekspresi gen penekan tumor seperti p53, p21 dan p27 serta menurunkan cyclin D1 sehingga dapat menginduksi apoptosis (Crespo, *et al.*, 2008; Kuhar *et al.*, 2007).

### **D.2.3. Metode deteksi apoptosis**

Beberapa metode dilakukan oleh beberapa peneliti untuk mengidentifikasi terjadinya apoptosis pada sel kanker *in vitro*. *Flow cytometry* dan mikroskop fluoresen dapat digunakan untuk mendeteksi beberapa perubahan morfologi yang menjadi karakteristik sel yang mengalami apoptosis.

*Flow cytometry* dapat digunakan untuk menunjukkan persentase sel yang mengalami apoptosis pada populasi sel yang digunakan pada percobaan. Penggunaan *flow cytometry* dapat mendeteksi beberapa karakteristik terjadinya apoptosis yaitu fragmentasi DNA, perubahan ukuran sel dan bentuk granula, perubahan permeabilitas membrane plasma, modifikasi permukaan sel dan pembentukan badan apoptosis (Shan *et al.*, 2009; Russo *et al.*, 2009; Gibellini *et al.*, 2010).

Mikroskop fluoresen dapat digunakan untuk mendeteksi terjadinya apoptosis pada sel kanker *in vitro*. Deteksi dengan mikroskop fluoresen menggunakan dua pewarna sel yaitu *ethidium bromide* [(3,8-diamino-5-ethyl-6-phenyl phenanthridinum bromide)] dan *acridine orange* [3,6-bis(dimethyl)acridinium chloride hemi(zinc chloride salt)] (Pastre *et al.*, 2005).

*Acridine orange* (AO) dan *ethidium bromide* (EB) dapat berinterkalasi dengan DNA dan membentuk *fluorochrome* yang berwarna hijau dan orange. *Acridine orange* dapat memasuki plasma membrane sel hidup dan sel yang mengalami

apoptosis awal. Pengamatan dengan mikroskop fluoresen, sel hidup menunjukkan warna hijau terang dengan struktur utuh, sedangkan sel yang mengalami apoptosis awal *nutraceutical* menunjukkan warna hijau terang dan terlihat kondensasi kromatin. *Ethidium bromide* tidak dapat memasuki sel ketika sel masih hidup atau masih apoptosis awal. Apoptosis akhir pada sel dengan pewarnaan AO-EB, *ethidium bromide* menghasilkan intensitas emisi tertinggi. Sel yang mengalami apoptosis akhir menunjukkan warna orange dan kondensasi kromatin (Shi *et al.*, 2006; Srisala *et al.*, 2009).

#### **E. Studi Pendahuluan yang sudah dilaksanakan**

Penelitian hibah bersaing ini terdiri dari dua tahun yang terbagi menjadi 5 tahap. Road map penelitian disertasi terdapat pada Gambar 7.

**Studi yang telah dilakukan adalah identifikasi jenis senyawa bioaktif dalam kentang hitam dalam kaitannya dengan aktivitas antioksidan dan antiproliferasi pada ekstrak kentang hitam pada sel MCF-7.** Tahap ini penting karena belum ada penelitian dan publikasi yang berkaitan dengan jenis triterpenic acid yang terdapat dalam kentang hitam. Kulit, dan daging umbi diekstraksi dengan etanol kemudian ekstrak diaplikasikan untuk penelitian antioksidan baik secara *in vitro* maupun *system biologis* serta antiproliferasi pada sel kanker MCF-7.

#### **Hasil yang sudah dicapai**

Berdasarkan hasil pengujian identifikasi dan kuantifikasi triterpenic acid pada kentang hitam mentah, maka dapat diketahui jenis triterpenic acid yang ada adalah oleanolic acid dan ursolic acid. Hal itu menunjukkan kentang hitam mentah memiliki potensi sebagai bahan baku *nutraceutical* dengan keunggulan yaitu oleanolic acid dan ursolic acid yang bermanfaat mencegah penyakit kanker dan diabetes mellitus. Berdasarkan Tabel 1. menunjukkan bahwa bagian daging dan kulit kentang hitam memiliki kandungan ursolic acid dan oleanolic acid pada semua jenis pelarut yang digunakan.

Tabel 1. Kandungan *ursolic acid* (UA), *oleanolic acid* (OA) dan total *triterpenic acid* (TTA) pada bagian daging dan kulit kentang hitam menggunakan berbagai jenis pelarut

Pelarut	Daging kentang hitam			Kulit Kentang hitam		
	UA (µg/g sampel)	OA (µg/g sampel)	TTA (µg/g sampel)	UA (µg/g sampel)	OA (µg/g sampel)	TTA (µg/g sampel)
Metanol	2.16±0.00 <sup>a</sup>	0.96±0.01 <sup>a</sup>	3.12±0.02 <sup>a</sup>	15.71±0.00 <sup>b</sup>	3.04±0.00 <sup>a</sup>	18.75±0.00 <sup>a</sup>
Etanol	3.41±0.04 <sup>c</sup>	3.71±0.07 <sup>d</sup>	7.12±0.09 <sup>d</sup>	13.78±0.15 <sup>a</sup>	19.75±0.30 <sup>b</sup>	33.53±0.43 <sup>b</sup>
Etil asetat	2.78±0.02 <sup>b</sup>	1.68±0.01 <sup>c</sup>	4.46±0.02 <sup>b</sup>	18.44±0.00 <sup>c</sup>	35.32±0.04 <sup>d</sup>	53.76±0.05 <sup>c</sup>
Kloroform	3.77±0.01 <sup>d</sup>	1.30±0.01 <sup>b</sup>	5.06±0.01 <sup>c</sup>	22.09±0.01 <sup>d</sup>	34.03±0.02 <sup>c</sup>	56.11±0.02 <sup>d</sup>

Ket : angka merupakan rata-rata ± SD (n=3). Notasi yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan beda nyata (p<0.05).

Evaluasi antiproliferasi ekstrak daging dan kulit kentang hitam pada sel kanker payudara MCF-7 seperti terdapat pada Tabel 2.

Tabel 2. IC<sub>50</sub> perlakuan ekstrak etanol daging dan kulit, senyawa *ursolic acid*, *oleanolic acid*, *quercetin*, pada sel MCF 7 dengan variasi waktu 24, 48 dan 72 jam

Senyawa	IC <sub>50</sub> (µg/ml)		
	24 jam	48 jam	72 jam
<i>Ursolic acid</i>	9.02 ± 0.12 <sup>a</sup>	3.81 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.64± 0.03 <sup>a</sup>
<i>Oleanolic acid</i>	136.27 ± 7.19 <sup>b</sup>	48.61 ± 0.90 <sup>b</sup>	39.66 ± 0.55 <sup>b</sup>
Quercetin	135.21 ± 1.61 <sup>b</sup>	53.21 ± 0.68 <sup>b</sup>	28.19± 3.42 <sup>c</sup>
Ekstrak etanol daging kentang hitam	1512.97 ± 50.80 <sup>c</sup>	965.31 ± 3.39 <sup>c</sup>	829.86± 5.73 <sup>d</sup>
Ekstrak etanol kulit kentang hitam	1124.11 ± 5.19 <sup>d</sup>	812.22 ± 5.72 <sup>d</sup>	698.23 ± 1.61 <sup>e</sup>

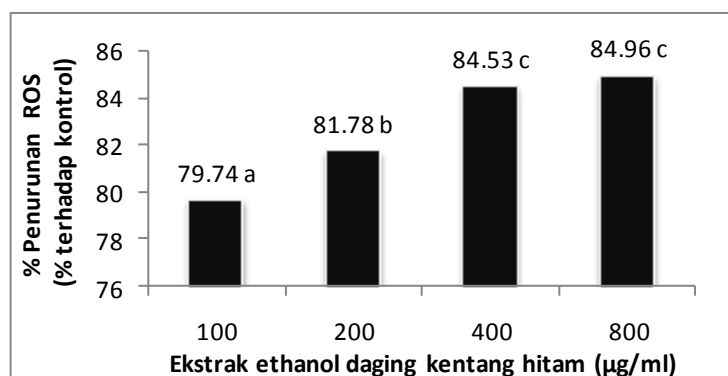
Ket : angka diekspresikan sebagai rata-rata ± SD (n=3). Angka dengan notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata (P<0.05)

### Hasil yang sudah dicapai pada evaluasi aktivitas antioksidan seluler

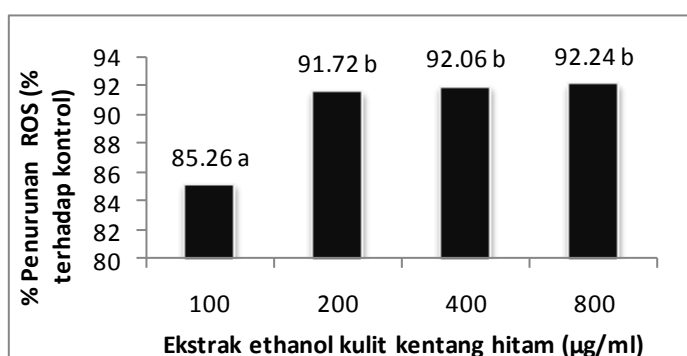
Ekstrak etanol memiliki kemampuan menurunkan jumlah reactive oxygen species (ROS) pada sel kanker payudara (MCF-7) (Gambar 8 dan 9). Namun



demikian diperlukan penelitian lanjutan mengenai kemampuan ekstrak etanol kentang hitam dalam mereduksi stress oksidatif pada sel kanker yang lain yaitu T47D dan HeLa serta mekanismenya dalam meningkatkan *antioxidant defense system* pada sel kanker. Penelitian ini penting dalam kaitannya untuk memberikan informasi yang lebih jelas mengenai mekanisme ekstrak etanol kentang hitam sebagai *nutraceutical* dalam mereduksi stress oksidatif melalui salah satu mekanisme yaitu mempengaruhi *antioxidant defense system* pada sel kanker yaitu aktivitas enzim superoksida dismutase dan enzim katalase.



Gambar 7. Persentase penurunan *reactive oxygen species* (ROS) dengan perlakuan ekstrak etanol daging kentang hitam pada sel MCF-7 yang diinduksi dengan *Phorbol Miristate Asetat*  
Ket : notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ( $p < 0.05$ ).

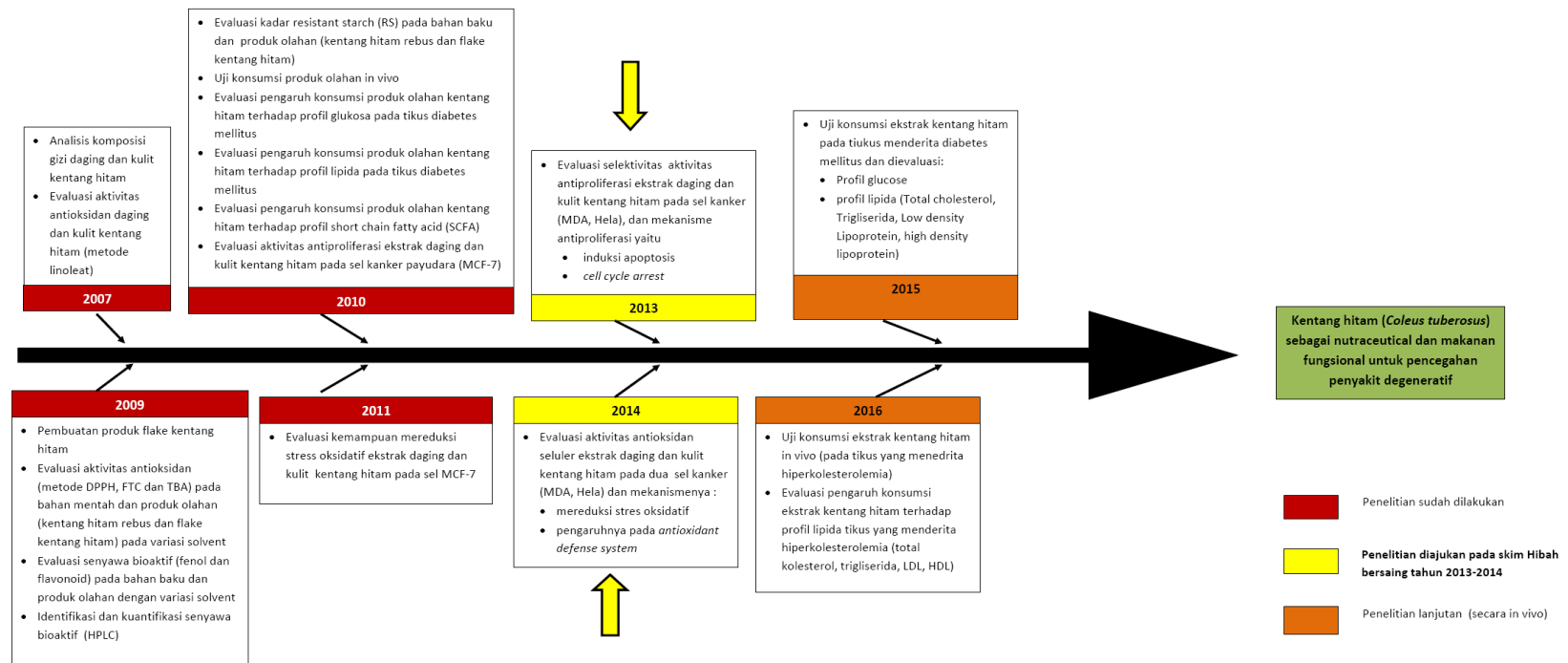


Gambar 8. Persentase penurunan *reactive oxygen species* (ROS) dengan perlakuan ekstrak etanol kulit kentang hitam pada sel MCF-7 yang diinduksi dengan *Phorbol Miristate Asetat*  
Ket : notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ( $p < 0.05$ ).

**Penelitian lanjutan diperlukan untuk aplikasi ekstrak kasar kulit dan daging kentang hitam dalam sistem biologis yaitu sel kanker T74D dan HeLa. Hal ini dimaksudkan untuk mengetahui selektivitas ekstrak etanol kentang hitam terhadap sel kanker yang berbeda dan mekanisme penghambatan anti-proliferasinya. Penelitian dalam sistem biologis ini penting dalam kaitannya untuk memberikan gambaran yang lebih nyata terhadap potensi ekstrak kasar kulit dan daging kentang hitam sebagai antiproliferasi sel kanker T74D, sel HeLa dan mekanisme antiproliferasinya diantaranya adalah mereduksi stress oksidatif, induksi apoptosis serta *cell cycle arrest*.**

Berdasarkan hasil penelitian selama dua tahun diharapkan dapat menjelaskan keterkaitan antara kemampuan ekstrak kentang hitam sebagai antioksidan di tingkat seluler dengan kemampuannya sebagai antiproliferasi sel kanker. Penelitian secara *in vitro* mengenai potensi antioksidan kentang hitam sebagai *nutraceutical* dalam pencegahan penyakit degeneratif terutama penyakit kanker diharapkan dapat menjadi acuan pengembangan ekstrak kentang hitam untuk meningkatkan derajat kesehatan masyarakat.

Penelitian pada hibah bersaing ini diharapkan menjadi acuan untuk penelitian lanjutan yaitu dalam kaitannya dengan kemampuannya mereduksi stress oksidatif pada hewan coba. Penelitian lanjutan diharapkan diujikan pada hewan coba yang menderita diabetes mellitus dan hiperkolesterolemia, dimana penyakit ini disebabkan karena stress oksidatif. Sehingga diperoleh informasi yang lengkap mengenai potensi ekstrak kentang hitam sebagai *nutraceutical* dalam pencegahan penyakit degenerative akibat oksidatif stress.



Gambar 9. Roadmap penelitian kentang hitam

### **BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

#### **C. Tujuan jangka panjang**

Tujuan jangka panjang dari penelitian ini adalah untuk mempelajari potensi kentang hitam dan mekanismenya sebagai *nutraceutical* berbasis bahan nabati dalam pengembangannya sebagai pencegah penyakit kanker.

#### **Tujuan Khusus Penelitian Hibah Bersaing tahun pertama**

1. Mengetahui selektivitas antiproliferasi *in vitro* ekstrak daging dan kulit kentang hitam terhadap sel kanker HeLa dan T47D.
2. Mengetahui kemampuan ekstrak daging dan kulit kentang hitam dalam menginduksi apoptosis sel kanker T47D dan HeLa
3. Mengetahui kemampuan ekstrak daging dan kulit kentang hitam dalam menginduksi *cell cycle arrest* pada sel kanker T47D dan HeLa

#### **Manfaat hibah bersaing tahun pertama:**

1. Memberikan informasi pada masyarakat mengenai potensi kentang hitam dalam mencegah penyakit kanker payudara dan serviks
2. Mendorong pembudidayaan kembali kentang hitam yang selama ini masih menjadi umbi minor di masyarakat

## BAB IV. METODE PENELITIAN

### A. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimen di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) unit III, Laboratorium Patologi Klinik Fakultas kedokteran Universitas Gadjah Mada.

### B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan dan alat penelitian yang digunakan dikelompokkan menjadi bahan dan alat analisis antiproliferasi dan analisis aktivitas antioksidan seluler *in vitro* sel kanker T47D, dan HeLa.

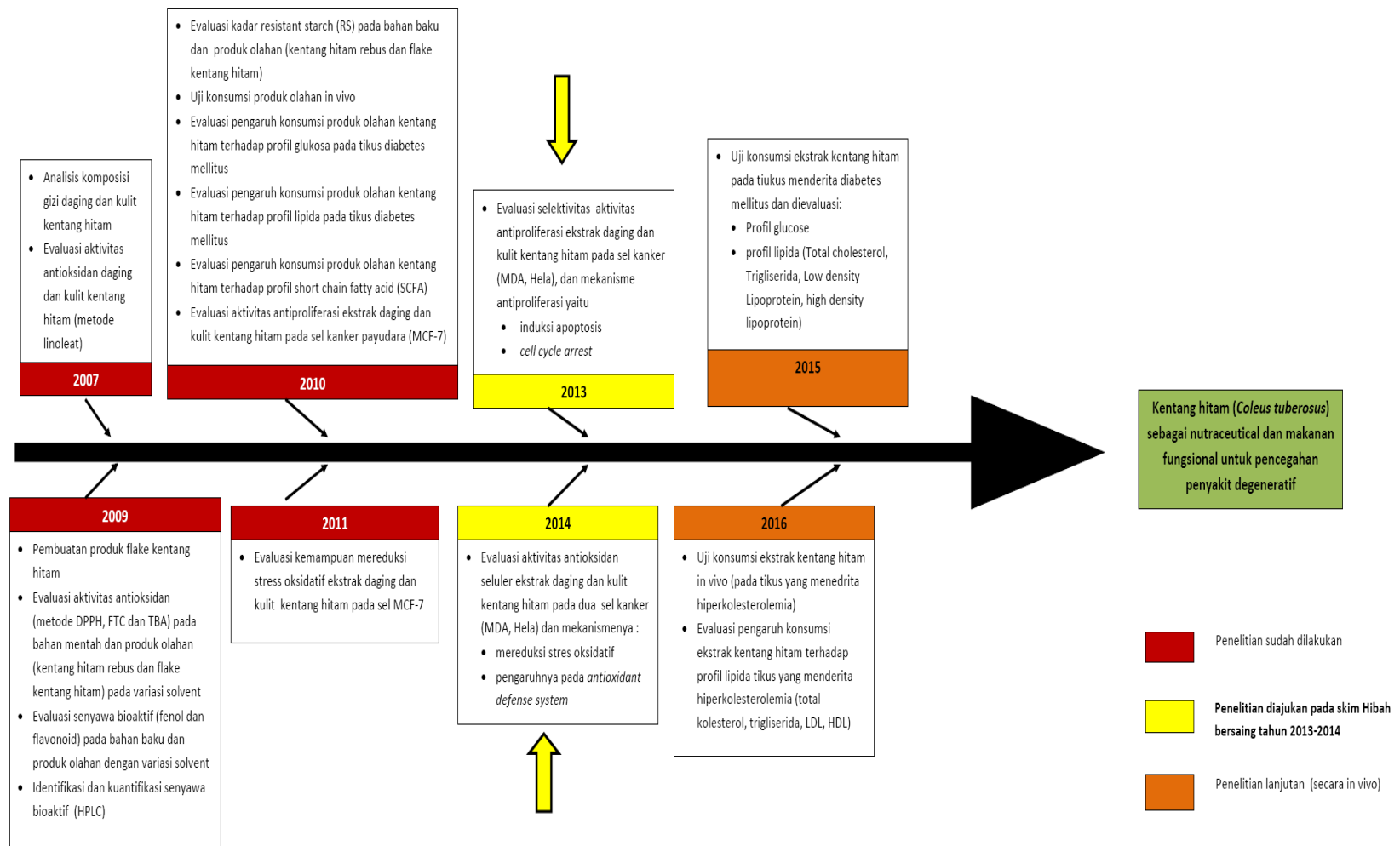
1. Bahan dan alat evaluasi selektivitas antiproliferasi *in vitro* pada sel kanker T47D, dan HeLa  
Bahan dasar: ekstrak etanol kulit dan daging kentang hitam mentah, dan *quercetin* (Sigma Aldrich), serta Sel *T47D* dan sel *HeLa*. Bahan kimia: *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM), RPMI (Sigma Aldrich), *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT) (Sigma Aldrich), DMSO (Sigma Aldrich), *Phosphate buffered saline* (PBS) (Gibco). Alat: *96-well plate*, *elisa reader* dan mikroskop merk Leitz, *laminar air flow* (LAF) kelas II, *Acridine orange-ethidium bromida*

2. Bahan dan alat evaluasi aktivitas antioksidan seluler *in vitro* pada sel kanker T47D, dan HeLa

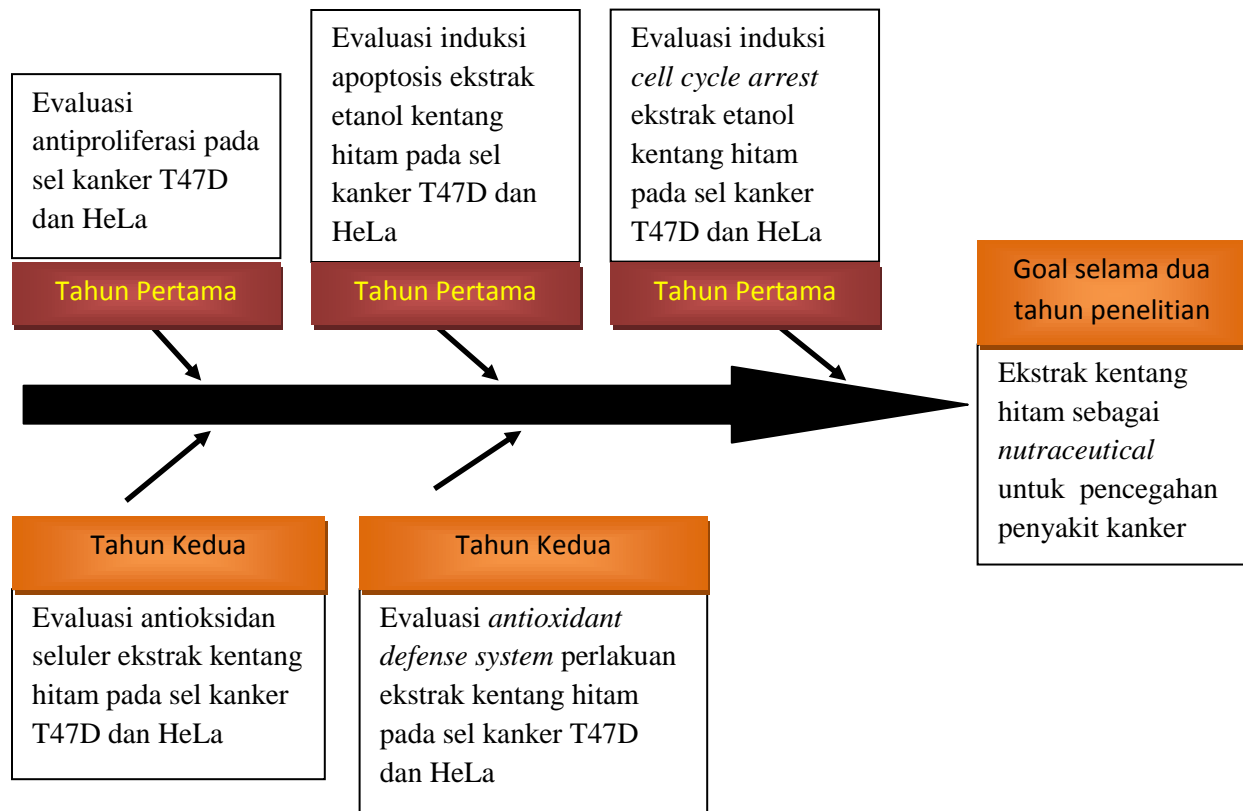
Bahan dasar: bahan yang akan diuji ada lima yaitu ekstrak etanol kulit dan daging kentang hitam mentah, *oleanolic acid*, *ursolic acid* dan *quercetin*, T47D, HeLa (ATCC, *American Type Culture Collection*). Bahan kimia: *2',7'-dichlorfluorescein-diacetate* (DCFH-DA) (Sigma Aldrich), *Phorbol myristate acetate* (PMA) (Sigma Aldrich), *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) (Sigma Aldrich), *Fetal Bovine Serum* (Gibco). Alat: *96-well microplate*, *flow cytometer*, dan *laminar air flow* (LAF) kelas II, Catalase kit dan SOD kit.

### C. Jalan Penelitian

Penelitian hibah bersaing ini adalah bagian dari road map penelitian untuk jangka panjang untuk mendapatkan informasi yang lengkap bagi pengembangan kentang hitam sebagai pangan fungsional dan nutraceutical pada pencegahan penyakit degeneratif Gambar 11 adalah:



Gambar 10. Roadmap penelitian Kentang Hitam



Gambar 11. Roadmap penelitian Hibah Bersaing selama 2 tahun

Pada Gambar 11 menunjukkan bahwa road map penelitian terdiri dari lima tahap dimana tujuan akhir atau goalnya adalah mengetahui mendapatkan ekstrak kentang hitam sebagai nutraceutical untuk pencegahan penyakit kanker. Penelitian yang diajukan pada penelitian hibah bersaing ini terdiri dari dua tahun.

Penelitian dibagi menjadi dua tahun, yaitu :

## 1. Tahun Pertama

### 1.1. Tahap pertama : Evaluasi antiproliferasi sel kanker T47D dan HeLa dengan inkubasi ekstrak daging dan kulit kentang hitam

Beberapa jenis metode untuk memprediksi karsinogenitas dilakukan secara in vitro. Prinsipnya adalah mereaksikan senyawa bioaktif dengan sel kanker yang menjadi sel uji coba. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay digunakan untuk mengevaluasi aktivitas anti-proliferasi ekstrak yang diuji dengan sel kanker. Pengujian didasarkan pada tetrazolium salt (MTT) menjadi formazan biru oleh enzim mitokondria

succinate dehydrogenase. Konversi hanya terdapat pada sel yang masih hidup dan jumlah formazan diproduksi secara proporsional pada jumlah sel hidup yang ada. Sehingga MTT assay potensial digunakan untuk menguji aktivitas anti-proliferasi dari ekstrak bahan (Osama et al, 2009).

Evaluasi yang digunakan mengacu pada Hogan et.al (2010). Sel kanker payudara (ATCC). Sel ( $1.5 \times 10^4$  sel/ml) diplate pada 96-well DMEM ditambah 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U Penicilin dan 100mg/ml Streptomycin. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. didiamkan selama 24 jam. Sel kanker diperlakukan selama 24 - 72 jam pada media eksperimen dengan ekstrak kasar kulit dan daging kentang hitam, oleanolic acid dan ursolic acid pada konsentrasi 5- 40 µg/ml. Viabilitas sel ditentukan dengan MTT assay.

Sel diplate pada kepadatan  $1,5 \times 10^4$  sel/ml. Setelah diinkubasi selama 24 - 72 jam, sel dicuci dengan HBSS dan kemudian diperlakukan dengan ekstrak (sampel) dalam media pertumbuhan yang diuji pada 96-well plate. Tiap perlakuan diulangi 3 sumuran. Sel kemudian diinkubasi selama 72 jam pada 5% CO<sub>2</sub>, 37°C pada incubator. Media yang diperlakukan dihilangkan pada akhir tiap periode inkubasi, dicuci dengan HBSS dan kemudian sel diinkubasi selama 4 jam dengan 50 µl larutan reagen MTT (0,5 mg/ml dalam DMEM) ditambahkan pada tiap-tiap sumuran, ditambah stop solution, diamkan selama semalam kemudian absorbansi direkam pada 570 nm dengan multilabel plate reader. Data absorbansi dibutuhkan untuk viabilitas seluler yang diekspresikan dengan persentase control (jumlah sel yang hidup pada sel control) di eksperimen. Setelah tiap perlakuan, dengan MTT assay.

$$\text{Viabilitas sel (\%)} = (\text{Abs perlakuan} / \text{Abs tanpa perlakuan}) \times 100.$$

## **1.2. Tahap kedua: Induksi apoptosis**

Pengamatan Apoptosis dengan Pengecatan DNA Cover slip (Nunc) ditanam ke dalam 6 well plate (Nunc) dan sel ( $2 \times 10^4$ ) didistribusikan di atasnya, lalu diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> dan ditambahkan fraksi uji dengan konsentrasi 150 µg/ml. Inkubasi dilanjutkan selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur diambil, kemudian cover slip diangkat dari sumuran dan diletakkan di atas obyek gelas lalu ditetesi dengan akridin oranye/etidium bromida (100 µg/ml akridin oranye (bio-Rad) dalam PBS dan 100 µg/ml etidium bromida (bio-Rad) dalam PBS). Pengamatan morfologi sel dilakukan dengan mikroskop fluoresens (Zeiss MC 80).



### 1.3. Tahap ketiga: *Cell cycle arrest*

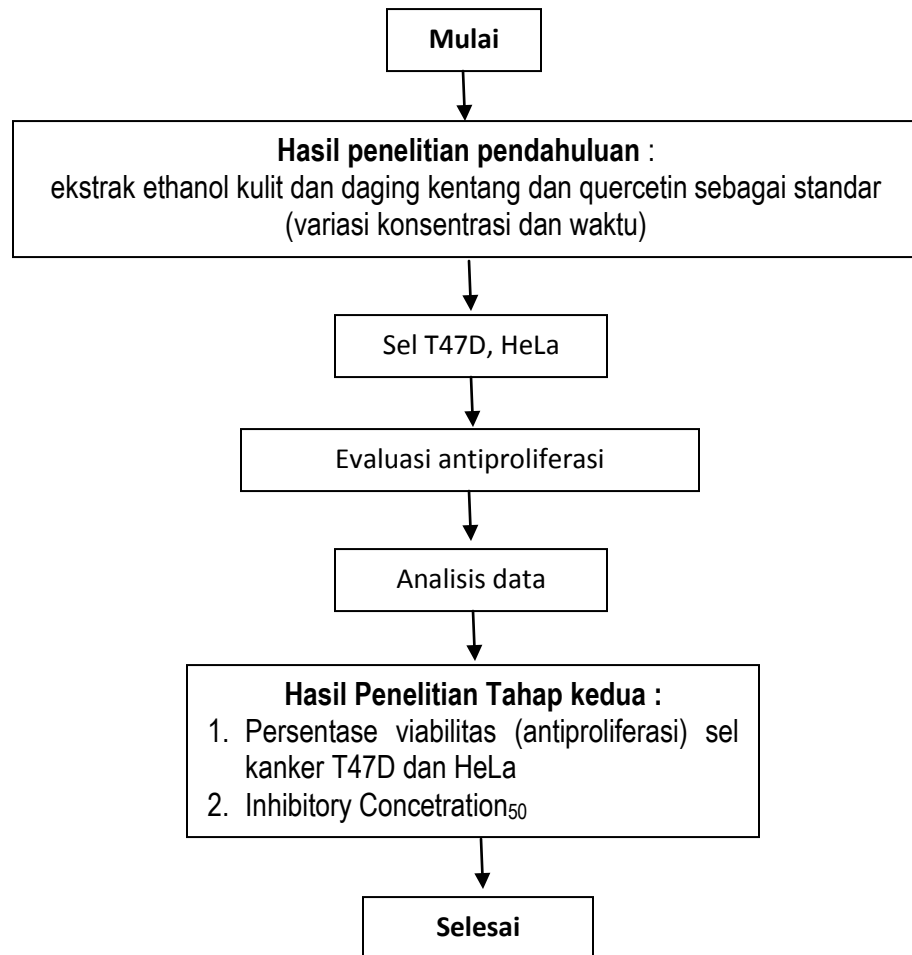
Sebanyak  $10^6$  cell/sumuran didistribusikan dalam lempeng 6 sumur, kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  untuk pengadaptasian sel. Sel diberi perlakuan dan diinkubasi kembali selama 24 dan 48 jam. Pada akhir waktu inkubasi, media diambil dan ditransfer ke dalam tabung sentrifugasi 1.5 ml. Setelah itu, media yang mengandung suspensi sel yang terlepas tersebut disentrifugasi (2000 rpm, 3 menit) dan supernatant dibuang. Pada sumuran yang telah diambil medianya ditambahkan PBS, dan PBS ditransfer ke dalam tabung sentrifugasi yang sama dari satu perlakuan, kemudian disentrifugasi dan supernatant dibuang kembali. Tahap ini diulangi sekali lagi, kemudian sel dipanen dengan tripsin-EDTA. Hasil panen sel ditransfer ke dalam tabung sentrifugasi yang sama dan disentrifugasi (2000 rpm, 30 detik). Sisa panen sel yang masih berada dalam sumuran dibilas dengan PBS dan disentrifugasi kembali, lalu PBS dibuang. Endapan sel di dalam tabung sentrifugasi selanjutnya dicuci dengan PBS dingin dan ditambah dengan pereaksi PI. Tabung sentrifugasi dibungkus aluminium foil dan diinkubasi dalam tangas air  $37^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit. Suspensi sel dihomogenkan kembali dan ditransfer ke dalam flowcytometer tube dan langsung dibaca dengan flowcytometer (Kumala et al., 2010).

Tabel 3. Uraian dan Hasil yang diharapkan pada penelitian Kentang Hitam

	Uraian	Luarannya	Indikator capaian
Tahap I	Evaluasi selektivitas antiproliferasi ekstrak kasar daging dan kulit kentang hitam, induksi apoptosis dan cell cycle arrest pada sel kanker T47D, HeLa	Diketahuinya informasi selektivitas antiproliferasi ekstrak kasar kentang hitam, induksi apoptosis dan cell cycle arrest pada sel kanker T47D, HeLa, <b>Submitted di Journal International dengan judul:</b> Judul : <i>Antiproliferation and apoptosis induced by ethanolic extract of Coleus tuberosus in cervix cancer cells.</i>	1. Persentase viabilitas sel kanker T47D, dan sel kanker HeLa berdasarkan variasi waktu dan konsentrasi pada perlakuan ekstrak etanol kentang hitam 2. Induksi apoptosis akibat inkubasi dengan ekstrak kasar kentang hitam pada sel kanker T47D, dan HeLa 3. Induksi cell cycle arrest akibat inkubasi dengan

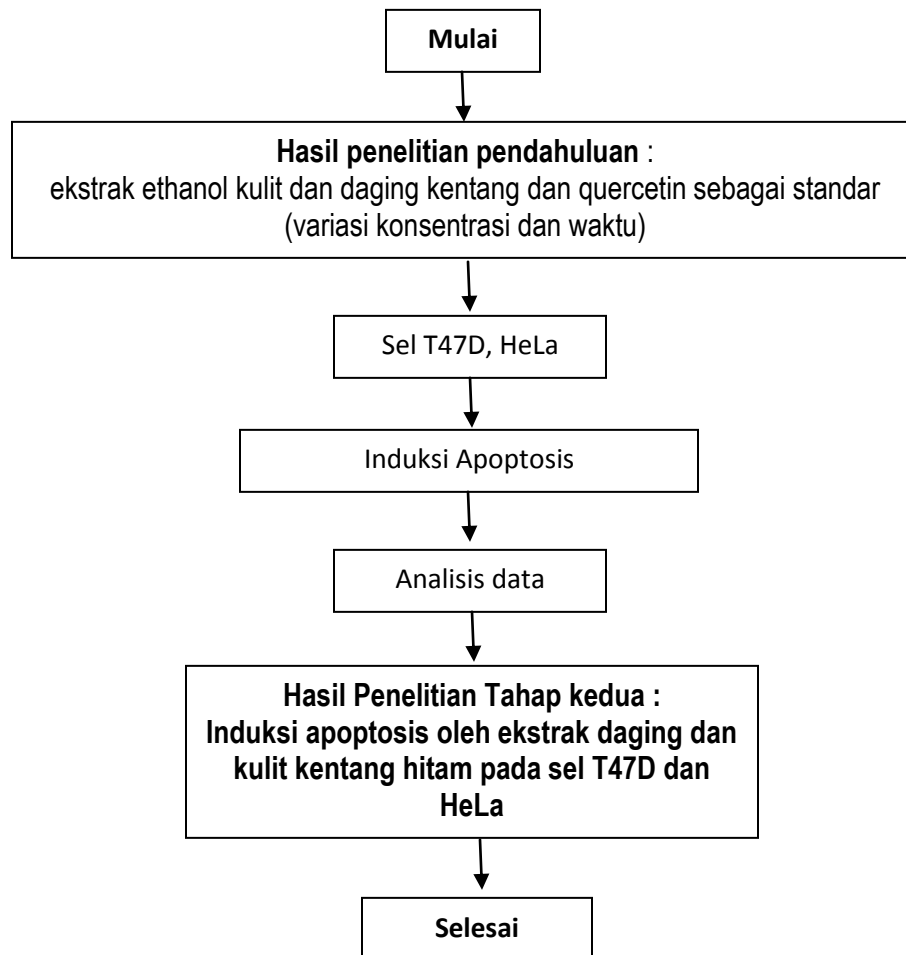
			<p>ekstrak etanol kentang hitam pada sel kanker T47D dan HeLa</p> <p>4. Artikel telah submitted pada jurnal International</p>
--	--	--	---

**Bagan Alir Penelitian Tahun Pertama, Tahap pertama :**



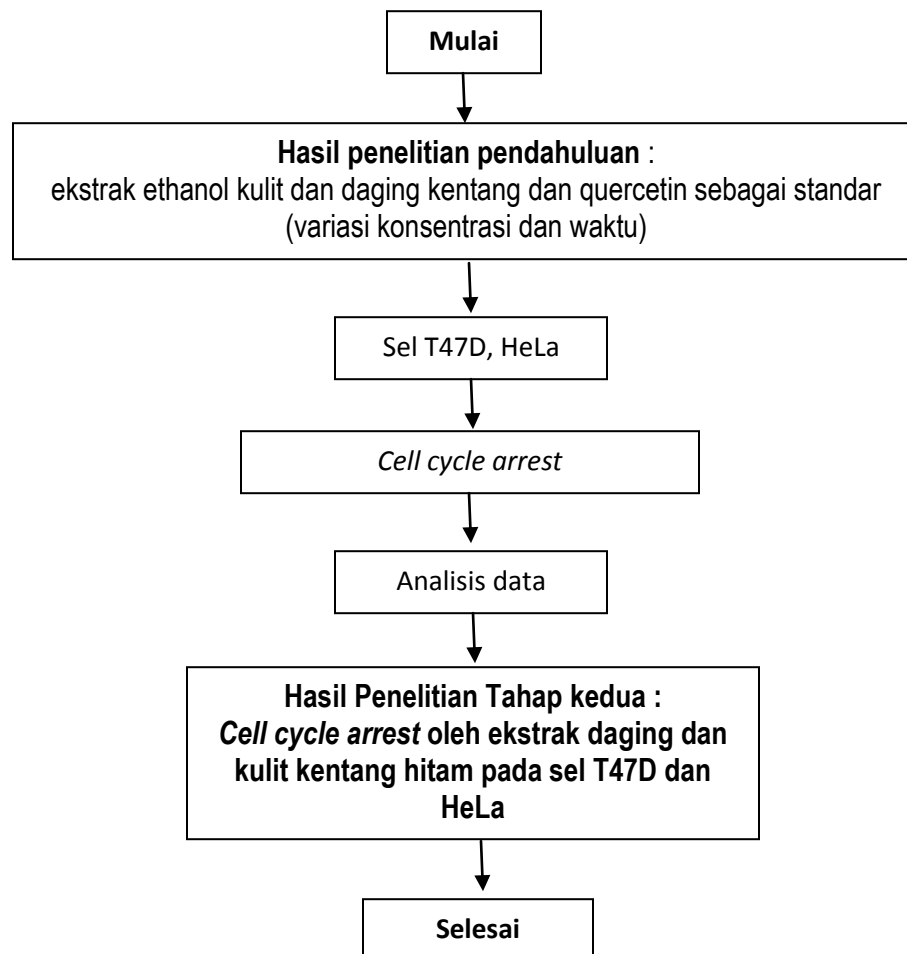
Gambar 12. Evaluasi antiproliferasi sel T47D dan HeLa

## Penelitian Tahun Pertama, Tahap Kedua



Gambar 13. Evaluasi induksi apoptosis pada sel kanker T47D dan HeLa

### Penelitian Tahun Pertama, Tahap Ketiga



Gambar 14. Evaluasi *cell cycle arrest* pada sel kanker T47D dan HeLa

**Analisis statistik**

Percobaan dilakukan dengan tiga ulangan. Data yang ditampilkan adalah rata-rata  $\pm$  SD dari tiga ulangan. Pengujian antiproliferasi dilakukan dengan anova satu jalur, apabila terdapat beda nyata kemudian dilanjutkan dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT). Korelasi antara metode pengujian dilakukan dengan *spearman correlation*, menggunakan SPSS versi 16.0.

## BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Perlakuan yang diberikan pada sel T47D dan HeLa dengan ekstrak etanol daging dan kulit kentang hitam dengan variasi konsentrasi menunjukkan penurunan *Inhibitory Concentration* ( $IC_{50}$ ) dengan bertambahnya waktu perlakuan. Berdasarkan Tabel tersebut menunjukkan bahwa Baik sel HeLa maupun sel T47D sensitif terhadap perlakuan dengan ekstrak etanol kulit kentang hitam yang ditunjukkan dengan rendahnya  $IC_{50}$  dibandingkan dengan perlakuan ekstrak etanol daging kentang hitam. Tabel 1 menunjukkan bahwa sel HeLa lebih sensitive dibandingkan dengan sel T47D pada perlakuan baik dengan ekstrak etanol daging maupun kulit kentang hitam.

Tabel 4.  $IC_{50}$  ekstrak etanol kulit dan daging kentang hitam pada sel T47D dan HeLa

Senyawa	IC50 (µg/ml)	
	T47D	HeLa
Ekstrak etanol daging kentang hitam	887,045±5,032	651.35±4,241
Ekstrak etanol kulit kentang hitam	548.18±4,524	366.41±3,524

Kemampuan menurunkan sel hidup dengan ekstrak etanol daging dan kulit kentang hitam diduga karena interaksi antara senyawa-senyawa bioaktif yang terdapat dalam ekstrak etanol daging dan kulit kentang hitam yaitu asam oleanolat, asam ursolat, fitosterol: stigmasterol, beta-sitosterol dan campesterol serta *maslinic acid*, dan senyawa fenol yang memberikan efek sinergisitas dalam menentukan kemampuan anti-proliferasinya.

Mutiara (2011) membuktikan bahwa kulit kentang hitam memiliki kadar *ursolic acid*, *oleanolic acid* dan total *triterpenic acid*) yang lebih tinggi dibandingkan daging. Penelitian ini membuktikan bahwa kulit kentang hitam bukanlah limbah, namun merupakan sumber *ursolic acid* dan *oleanolic acid* yang potensial. Kandungan *ursolic acid* dengan dengan pelarut ethanol pada kulit dan daging kentang hitam adalah 2.16 – 22.09 µg/g tepung kulit atau daging umbi kering. Beberapa penelitian kandungan *ursolic acid* dan *oleanolic acid* lebih banyak dilakukan pada tanaman obat, seperti yang telah dilakukan Silva *et al.* (2008) yang melaporkan bahwa kandungan *ursolic acid* pada *Ocimum species* yang digunakan sebagai tanaman untuk

pengobatan di Brazil (2.7 – 20.2 mg/gr tepung daun *Ocimum species*). Penelitian Leng (2011) menunjukkan bahwa kandungan *ursolic acid* pada beberapa *Rosmarinus officinalis* adalah 1.23-2.85 mg/g, sedangkan *oleanolic acid* adalah 0.69-1.44 mg/g. Berdasarkan pada kandungan *ursolic acid* dan *oleanolic acid* yang terdapat di dalam daun *Ocimum* dan daun *Rosmarinus officinalis*, maka bagian daging dan terutama bagian kulit kentang hitam memiliki kandungan *ursolic acid* lebih kecil, namun demikian kentang hitam sebagai tanaman pangan sumber karbohidrat berpotensi sebagai sumber *ursolic acid* dan *oleanolic acid*.

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa bagian kulit mengandung senyawa bioaktif terutama *triterpenic acid* (*ursolic acid* dan *oleanolic acid*) lebih tinggi dibandingkan dengan bagian daging. Berdasarkan pendekatan bahwa *triterpenic acid* adalah metabolit sekunder yang berfungsi untuk mempertahankan diri dari kondisi lingkungan, maka besarnya kandungan *triterpenic acid* pada bagian kulit diduga karena kulit merupakan pertahanan pertama bagi umbi kentang hitam terhadap lingkungan sekitarnya, baik jamur, bakteri, hewan pemakan tumbuhan, serangga, maupun kondisi tanah tempat tumbuh. Kulit memberikan respon yang lebih cepat dalam memproduksi *triterpenic acid* untuk mempertahankan diri dari kondisi lingkungan. Hal ini sesuai dengan penelitian Utomo *et al.* (2008) yang menyatakan bahwa adanya perubahan kondisi lingkungan tumbuh dari kacang tanah dapat meningkatkan akumulasi *daidzein* sampai 7 kali lipat. Hal itu menunjukkan bahwa akar kacang tanah merespon adanya faktor perubahan kondisi lingkungan disebabkan akar kacang tanah termasuk bagian penting untuk penimbunan cadangan makanan tanaman.

Besarnya kandungan *triterpenic acid* pada bagian kulit daripada bagian daging sejalan dengan beberapa penelitian yang membuktikan bahwa bagian kulit, umumnya memiliki kandungan senyawa bioaktif yang lebih tinggi dibandingkan bagian daging. Penelitian Im *et al.* (2008) dan Nara *et al.* (2006) menunjukkan bahwa kulit kentang dari beberapa varietas memiliki kandungan senyawa bioaktif lebih tinggi dibandingkan daging kentang.

Pelarut etanol dipilih sebagai pelarut dalam penelitian lebih lanjut dengan pertimbangan: (1) Aplikasi pada tahapan selanjutnya dilakukan pada sistem biologis, sehingga pelarut dipilih yang cenderung tidak bersifat toksik bagi sel kanker dan (2) Kentang hitam diarahkan penggunaannya sebagai makanan. Oleh karena proporsi bagian daging lebih tinggi dibandingkan bagian kulit, maka pelarut yang memberikan kandungan *triterpenic acid* tertinggi pada bagian daging dipilih sebagai pelarut untuk ekstraksi selanjutnya.



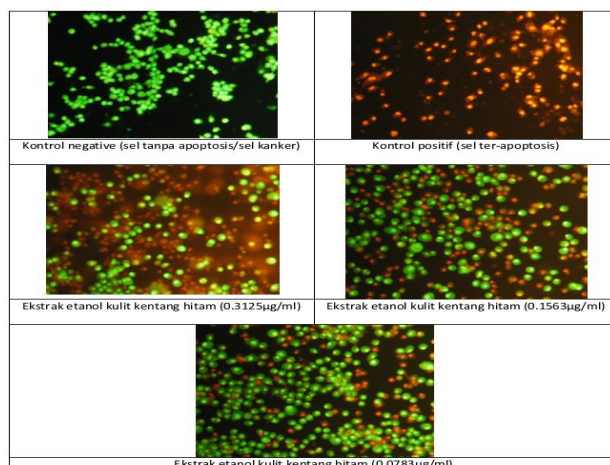
Penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak etanol daging dan kulit kentang hitam mampu menghambat proliferasi pada sel T47D dan HeLa. Hal ini diduga berkaitan dengan aktivitas anti-proliferasi sel kanker yang dimiliki oleh senyawa bioaktif didalam kentang hitam, seperti UA, OA, *maslinic acid*, fitosterol dan senyawa fenol (Zhang *et al.*, 2007; Arshad *et al.*, 2010; Nisa *et al.*, 2011). *Maslinic acid* dan fitosterol memiliki aktivitas anti-proliferasi pada beberapa sel kanker (Li *et al.*, 2010; Reyes-zurita *et al.*, 2009; Award and Fink, 2000; Bardford and Award, 2007; Jayaprakasha *et al.*, 2007). Senyawa fenol memiliki aktivitas anti-proliferasi pada beberapa sel kanker (Althunibat, 2009; Yanez *et al.*, 2004; Przybylska *et al.*, 2007).

Mekanisme anti-proliferasi ekstrak etanol daging kentang hitam, ekstrak etanol kulit kentang hitam diduga sejalan dengan senyawa yang terkandung didalamnya yaitu *ursolic acid*, dan *oleanolic acid* pada sel T47D dan HeLa diduga melalui jalur, yaitu:

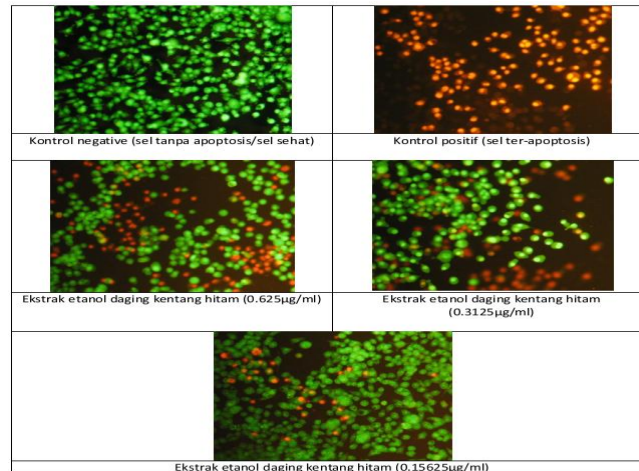
- (1) Pengendalian siklus sel beserta ekspresi gen yang mengatur siklus sel yaitu p27, p21, p53, dan *Cyclin D1*. Penurunan ROS yang dibuktikan dengan evaluasi aktivitas antioksidan seluler (Gambar 30-34). Penurunan ROS diduga berdampak pada penurunan NF-kB, sebab ekspresi NF-kB tergantung pada induksi ROS. Penurunan NF-kB dapat memberikan efek penurunan ekspresi *Cyclin D1* dan peningkatan *tumor suppressor* seperti p27, p21 dan p53, sehingga terjadi *cell cycle arrest* (Lie jie *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2007; Shyu *et al.*, 2010; Shishodia *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2000; Pathak *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2006; Ong *et al.*, 2004; Mu *et al.*, 2007; Beniston dan Campo 2003; Iwao and Tsukamoto, 1999; Obinaju *et al.*, 2010; Chou *et al.*, 2010)
- (2) Fragmentasi DNA melalui peningkatan *apoptosis-inducing factor* (AIF). Fragmentasi DNA dibuktikan dengan evaluasi pengecatan menggunakan *acridine orange-ethidium bromide* yang menunjukkan terjadinya induksi apoptosis (Gambar 42). Salah satu ciri apoptosis adalah terjadinya fragmentasi DNA yang dengan pengecatan AO-EB akan berwarna orange karena terjadi interkalasi antara EB dan DNA. Sel MCF-7 yang digunakan pada penelitian ini berasal dari ATCC, yang memiliki karakteristik tidak mengekspresikan caspase 3 sebagai eksekutor terjadinya fragmentasi DNA pada induksi apoptosis. Berdasarkan hal tersebut, maka induksi apoptosis oleh OA pada sel MCF-7 melalui mekanisme lain yaitu *Apoptosis inducing factor* (AIF) (Kwon *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010).

## Evaluasi aktivitas induksi apoptosis

Terjadinya kematian sel akibat perlakuan ekstrak etanol kulit dan daging kentang hitam melalui induksi apoptosis pada sel HeLa dan T47D didukung oleh penelitian menggunakan pewarnaan sel T47D dan sel HeLa dengan *Acridine Orange-Ethidium Bromide* (AO/EB). Anti-proliferasi ekstrak etanol kulit dan daging kentang hitam terhadap sel T47D dan HeLa diduga dengan cara menginduksi apoptosis. Hal ini sesuai dengan evaluasi pewarnaan T47D dan HeLa menggunakan AO-EB. *Acridine orange-ethidium bromide* digunakan untuk menggambarkan sel dengan perubahan organisasi kromatin. *Acridine orange* digunakan untuk menunjukkan jumlah sel yang akan mengalami apoptosis tetapi AO tidak bisa membedakan sel hidup dan tidak hidup. Untuk mendapatkan gambaran yang jelas bahwa sel akan mengalami apoptosis tetapi masih hidup dan sel mengalami kematian karena telah terjadi apoptosis, maka digunakan ethidium bromida yang dapat berinterkalasi dengan DNA maupun RNA dan memberikan warna merah (Nafisi *et al.*, 2002; Olmsted and Kearns, 1997).



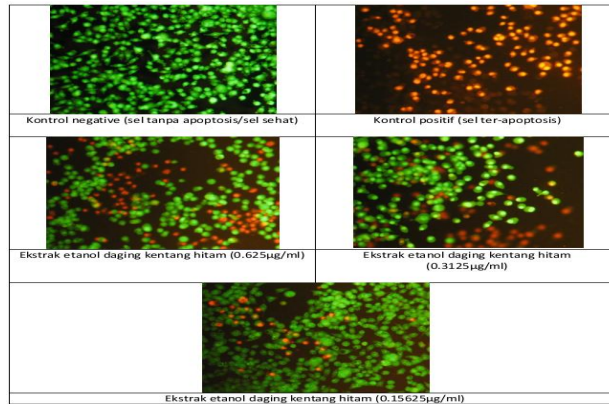
Gambar 15. Induksi apoptosis pada sel T47D dengan ekstrak kulit kentang hitam. (A) kontrol negatif; (B) control positif; (C) ekstrak etanol kulit kentang hitam (EEKK) dan (D) ekstrak etanol kulit kentang hitam (EEKK). Pengamatan morfologi sel MCF-7 yang mengalami apoptosis dilakukan dengan pengecatan *acridine orange/ethidium bromide* dan diamati dengan mikroskop fluoresen. Kontrol (A) sel hidup, bentuk normal dan berwarna hijau; kontrol (B), sel apoptosis; C, D, dan E menunjukkan induksi apoptosis, beberapa sel telah mati, berubah bentuk, serta warna sel menjadi hijau terang sampai *orange*. Apoptosis awal (warna hijau terang), apoptosis akhir (warna *orange*).



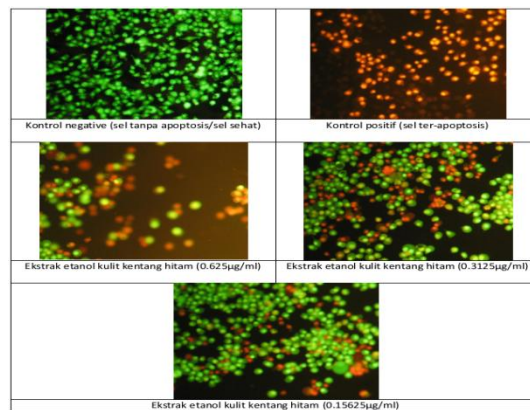
Gambar 16. Induksi apoptosis pada sel T47D dengan ekstrak daging kentang hitam. (A) kontrol negatif; (B) control positif; (C) ekstrak etanol kulit kentang hitam (EEKK) dan (D) ekstrak etanol kulit kentang hitam (EEKK). Pengamatan morfologi sel MCF-7 yang mengalami apoptosis dilakukan dengan pengecatan *acridine orange/ethidium bromide* dan diamati dengan mikroskop fluoresen. Kontrol (A) sel hidup, bentuk normal dan berwarna hijau; kontrol (B), sel apoptosis; C, D, dan E menunjukkan induksi apoptosis, beberapa sel telah mati, berubah bentuk, serta warna sel menjadi hijau terang sampai *orange*. Apoptosis awal (warna hijau terang), apoptosis akhir (warna *orange*).

Kombinasi AO-EB dapat digunakan baik sel hidup maupun sel mati yang mengalami apoptosis. Fluoresensi akan berwarna hijau ketika berikatan dengan DNA *double stranded* pada sel hidup dan fluoresensi akan berwarna merah ketika berikatan dengan *single stranded* DNA yang didominasi pada sel mati. Sel yang mengalami apoptosis awal akan mengalami fragmentasi DNA yang memberikan warna hijau pada *nucleus*. Sedangkan pada proses apoptosis akhir, DNA mengalami fragmentasi dan akan berwarna merah (Ho *et al.*, 2009). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa UA, OA, *quercetin*, ekstrak kulit dan daging kentang hitam menginduksi apoptosis yang diindikasikan dengan terjadinya fragmentasi DNA.

Fragmentasi DNA akan berwarna *orange*, karena sel kehilangan integritas membran (Sivalokanathan *et al.*, 2006), sehingga EB dapat masuk ke dalam sel dan berinterkalasi dengan DNA yang telah mengalami fragmentasi. Sel kanker dengan perlakuan senyawa bioaktif dapat mengalami apoptosis dan fragmentasi DNA (Sivalokanathan *et al.*, 2006; Dedoussis *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2006).



Gambar 17. Induksi apoptosis pada sel HeLa dengan ekstrak daging kentang hitam. (A) kontrol negatif; (B) control positif; (C) ekstrak etanol kulit kentang hitam (EEKK) dan (D) ekstrak etanol kulit kentang hitam (EEKK). Pengamatan morfologi sel MCF-7 yang mengalami apoptosis dilakukan dengan pengecatan *acridine orange/ethidium bromide* dan diamati dengan mikroskop fluoresen. Kontrol (A) sel hidup, bentuk normal dan berwarna hijau; kontrol (B), sel apoptosis; C, D, dan E menunjukkan induksi apoptosis, beberapa sel telah mati, berubah bentuk, serta warna sel menjadi hijau terang sampai *orange*. Apoptosis awal (warna hijau terang), apoptosis akhir (warna *orange*).



Gambar 18. Induksi apoptosis pada sel HeLa dengan ekstrak daging kentang hitam. (A) kontrol negatif; (B) control positif; (C) ekstrak etanol kulit kentang hitam (EEKK) dan (D) ekstrak etanol kulit kentang hitam (EEKK). Pengamatan morfologi sel MCF-7 yang mengalami apoptosis dilakukan dengan pengecatan *acridine orange/ethidium bromide* dan diamati dengan mikroskop fluoresen. Kontrol (A) sel hidup, bentuk normal dan berwarna hijau; kontrol (B), sel apoptosis; C, D, dan E menunjukkan induksi apoptosis,

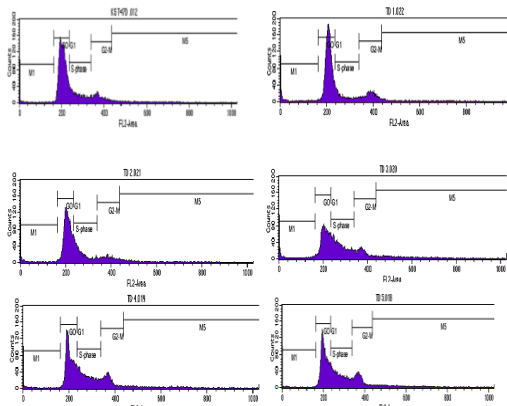
beberapa sel telah mati, berubah bentuk, serta warna sel menjadi hijau terang sampai *orange*. Apoptosis awal (warna hijau terang), apoptosis akhir (warna *orange*).

Perlakuan ekstrak etanol daging kentang hitam dan ekstrak etanol kulit kentang hitam dapat menginduksi apoptosis, ditandai dengan perubahan bentuk, kondensasi kromatin dan degradasi DNA yang dengan pengecatan *Acridine orange/ethidium bromide* menunjukkan warna hijau terang pada sel kanker T47D dan HeLa yang mengalami apoptosis awal dan warna *orange* pada sel yang mengalami apoptosis akhir. Warna sel kontrol adalah hijau, yang berarti EB tidak dapat masuk ke dalam sel karena sel masih hidup. *Acridine orange* adalah pewarna sel yang berperan dalam pewarnaan sel yang masih hidup.

Sel yang mengalami apoptosis menyebabkan perubahan permeabilitas membran sel (Wang *et al.*, 2005; Hirsch *et al.*, 1997). Perubahan permeabilitas sel menyebabkan AO-EB dapat masuk dan berinterkalasi dengan DNA yang ditandai dengan adanya warna *orange* pada sel (Attari *et al.*, 2009). Sedangkan sel yang berwarna hijau terang menunjukkan sel mengalami apoptosis awal, yaitu terjadi kondensasi kromatin yang menyebabkan kromatin menyerap lebih banyak warna dibandingkan kontrol, sehingga sel berwarna hijau terang, namun demikian sel masih hidup, sehingga hanya AO yang dapat mewarnai sel hidup (Zhang *et al.*, 1998; Jeune *et al.*, 2005).

### **Evaluasi Cell cycle arrest**

Hasil penelitian menggunakan analisis flow cytometry (Beckton coulter, USA) hambatan siklus sel T47D dan HeLa yang diinduksi oleh berbagai konsentrasi ekstrak etanol daging kentang hitam dan ekstrak etanol kulit dan daging kentang hitam (125; 62,5; 31,25; 15,625 dan 7,8125 µg/ml) diketahui sebagai berikut: data penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 19 menunjukkan bahwa hambatan siklus sel T47D mulai terjadi pada sel yang diinduksi ekstrak etanol daging kentang hitam pada 7,8125µg/ml pada siklus S fase dan G2-M, selain itu juga mengalami apoptosis pada fase sub-G 1 (M1). Induksi sel T47D dengan ekstrak etanol daging kentang hitam menyebabkan hambatan siklus sel pada fase S, G2-M dan fase sub-G 1 (M1); dibandingkan dengan kontrol.



Marker	Events	% Gated	% Total
All	10000	100.00	100.00
M1	1018	10.18	10.18
GO-G1	5740	57.40	57.40
S-phase	1821	18.21	18.21
G2-M	1129	11.29	11.29
M5	364	3.64	3.64

Marker	Events	% Gated	% Total
All	10000	100.00	100.00
M1	1931	19.31	19.31
GO-G1	5285	52.85	52.85
S-phase	1180	11.80	11.80
G2-M	1334	13.34	13.34
M5	329	3.29	3.29

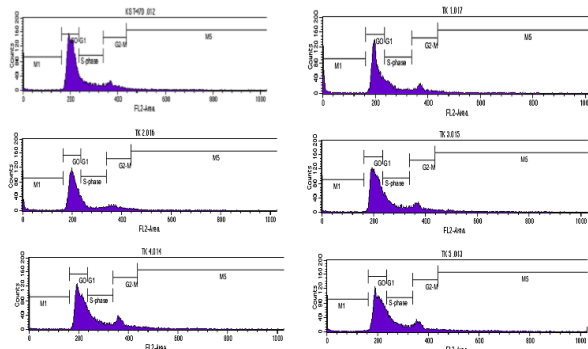
Marker	Events	% Gated	% Total
All	10000	100.00	100.00
M1	1991	19.91	19.91
GO-G1	4670	46.70	46.70
S-phase	1986	19.86	19.86
G2-M	967	9.97	9.97
M5	426	4.26	4.26

Marker	Events	% Gated	% Total
All	10000	100.00	100.00
M1	668	6.68	6.68
GO-G1	4305	43.05	43.05
S-phase	2804	28.04	28.04
G2-M	1542	15.42	15.42
M5	753	7.53	7.53

Marker	Events	% Gated	% Total
All	10000	100.00	100.00
M1	516	5.16	5.16
GO-G1	4357	43.57	43.57
S-phase	2901	29.01	29.01
G2-M	1599	15.99	15.99
M5	715	7.15	7.15

Gambar 19. Perlakuan ekstrak etanol daging kentang hitam pada sel T47D

Hasil statistik menunjukkan perbedaan yang nyata antara hambatan siklus sel fase G0-G1, S, G2-M, dan sub-G1 dengan konsentrasi ekstrak etanol daging kentang hitam pada lima konsentrasi. Dari semua hasil penelitian ini diketahui bahwa hambatan siklus sel T47D yang diinduksi ekstrak etanol daging kentang hitam melalui analisis flow cytometry terjadi pada fase S-G2-M, sedangkan apoptosis terdeteksi pada fase sub-G1 pada sel yang diinduksi EEKK 7,8125µg/ml.



Marker	Events	% Gated	% Total
All	10000	100.00	100.00
M1	1018	10.18	10.18
GO-G1	5740	57.40	57.40
S-phase	1821	18.21	18.21
G2-M	1129	11.29	11.29
M5	364	3.64	3.64

Marker	Events	% Gated	% Total
All	10000	100.00	100.00
M1	3215	32.15	32.15
GO-G1	4009	40.09	40.09
S-phase	1565	15.65	15.65
G2-M	897	8.97	8.97
M5	357	3.57	3.57

Marker	Events	% Gated	% Total
All	10000	100.00	100.00
M1	3670	36.70	36.70
GO-G1	4158	41.58	41.58
S-phase	1115	11.15	11.15
G2-M	835	8.35	8.35
M5	278	2.78	2.78

Marker	Events	% Gated	% Total
All	10000	100.00	100.00
M1	1131	11.31	11.31
GO-G1	5012	50.12	50.12
S-phase	2201	22.01	22.01
G2-M	1176	11.76	11.76
M5	540	5.40	5.40

Marker	Events	% Gated	% Total
All	10000	100.00	100.00
M1	792	7.92	7.92
GO-G1	4883	48.83	48.83
S-phase	2352	23.52	23.52
G2-M	1404	14.04	14.04
M5	648	6.48	6.48

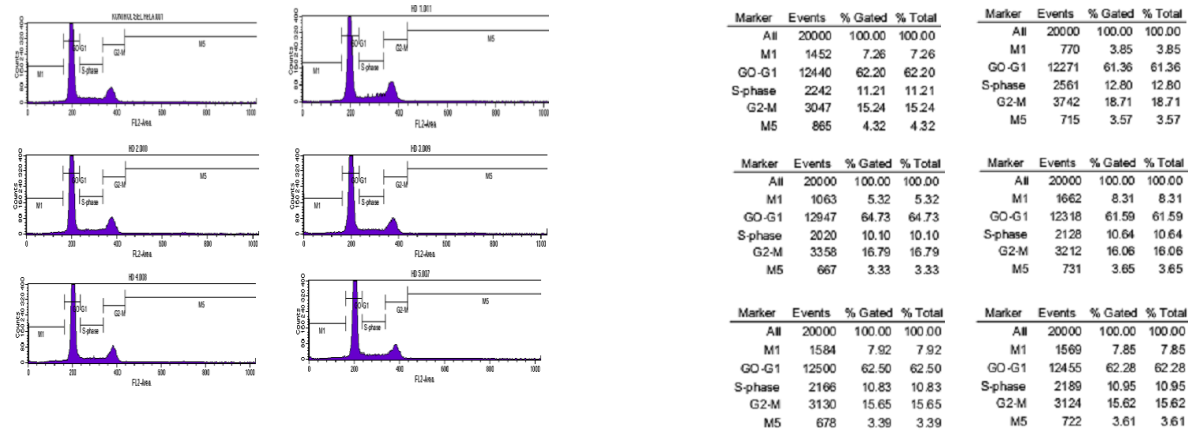
Marker	Events	% Gated	% Total
All	10000	100.00	100.00
M1	913	9.13	9.13
GO-G1	4938	49.38	49.38
S-phase	2359	23.59	23.59
G2-M	1191	11.91	11.91
M5	675	6.75	6.75

Gambar 20. Perlakuan ekstrak etanol kulit kentang hitam pada sel T47D

Gambar 20 menunjukkan bahwa hambatan siklus sel T47D mulai terjadi pada sel yang diinduksi ekstrak etanol kulit kentang hitam pada 7,8125µg/ml pada siklus S fase dan G2-M, selain itu juga mengalami apoptosis pada fase sub-G 1 (M1). Induksi sel T47D dengan ekstrak etanol kulit kentang hitam menyebabkan hambatan siklus sel pada fase S, G2-M dan fase sub-G 1 (M1); dibandingkan dengan kontrol. hasil penelitian ini diketahui bahwa hambatan siklus sel

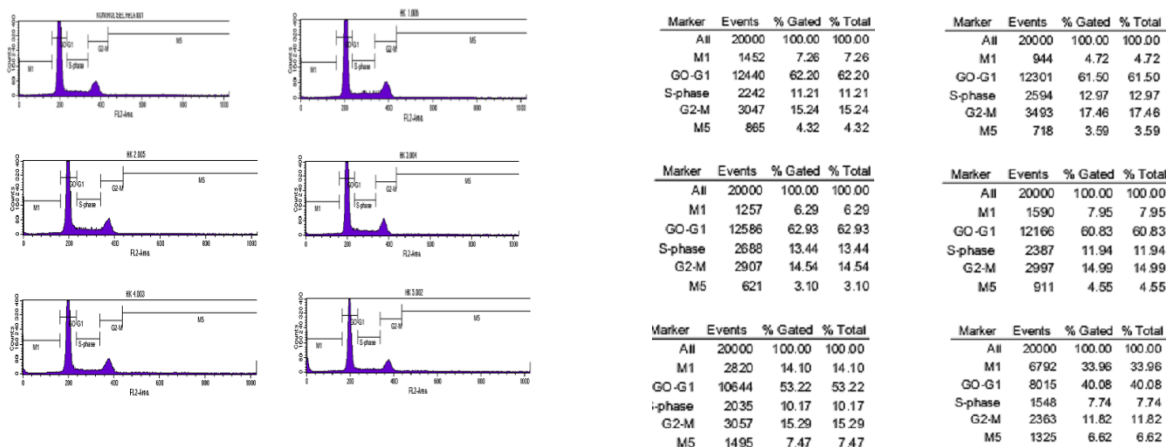


T47D yang diinduksi ekstrak etanol daging kentang hitam melalui analisis flow cytometry terjadi pada fase S-G2-M, sedangkan apoptosis terdeteksi pada fase sub-G1.



Gambar 21. Perlakuan ekstrak etanol daging kentang hitam pada sel HeLa

Gambar 21 menunjukkan bahwa hambatan siklus sel HeLa mulai terjadi pada sel yang diinduksi ekstrak etanol daging kentang hitam pada 7,8125µg/ml pada siklus G2-M fase, selain itu juga mengalami apoptosis pada fase sub-G1 (M1). Induksi sel T47D dengan ekstrak etanol kulit kentang hitam menyebabkan hambatan siklus sel pada fase G2-M. Hasil penelitian ini diketahui bahwa hambatan siklus sel HeLa yang diinduksi ekstrak etanol daging kentang hitam melalui analisis flow cytometry terjadi pada fase G2-M, sedangkan apoptosis terdeteksi pada fase sub-G1 pada sel yang diinduksi ekstrak etanol daging kentang hitam 7,8125µg/ml.



Gambar 22. Perlakuan ekstrak etanol kulit kentang hitam pada sel HeLa

Gambar 22 menunjukkan bahwa hambatan siklus sel HeLa mulai terjadi pada sel yang diinduksi ekstrak etanol daging kentang hitam pada 7,8125µg/ml pada siklus S, G2-M fase, selain itu juga

mengalami apoptosis pada fase sub-G1 (M1). Induksi sel T47D dengan ekstrak etanol kulit kentang hitam menyebabkan hambatan siklus sel pada fase S, G2-M. Hasil penelitian ini diketahui bahwa hambatan siklus sel HeLa yang diinduksi ekstrak etanol kulit kentang hitam melalui analisis flow cytometry terjadi pada fase S, G2-M, sedangkan apoptosis terdeteksi pada fase sub-G1 pada sel yang diinduksi ekstrak etanol kulit kentang hitam.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa analisis molekuler dilakukan terhadap protein-protein yang terlibat pada fase G2-M yaitu Cdc-2 dan p21 dan protein penanda aktivasi Caspase-3 (cleavage Caspase-3) dan penanda apoptosis (cleavage PARP). Cdc-2 merupakan kinase yang meregulasi siklus sel pada fase G2-M. Kinase Wee1 dan Myt1 dapat menginaktivkan Cdc-2 melalui proses fosforilasi, keduanya merupakan substrat Caspase. Aktivasi Caspase dapat memacu terjadinya aktivasi Cdc-2 dan memacu sel memasuki fase mitosis. Hal ini berarti ekstrak etanol kulit dan daging kentang hitam diduga dapat memacu aktivasi caspase sehingga dapat memacu aktivasi Cdc-2 yang menyebabkan sel tidak dapat memasuki fase mitosis dan diikuti dengan hiperploidi pada sel T47D dan HeLa.

Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan aktivasi Cdc-2 dapat memacu terjadinya apoptosis. Penelitian lain menunjukkan bahwa aktivasi Cdc-2 merupakan terminal efektor proses apoptosis. Hal ini menunjukkan bahwa aktivasi Cdc-2 dapat berperan sebagai penyebab maupun sebagai konsekuensi proses apoptosis. Namun adanya populasi yang lebih tinggi dibandingkan control pada fase sub G1 (M1) dapat pula disebabkan oleh mekanisme kematian lain tanpa melalui aktivasi Caspase melalui pelepasan sitokrom C.

Hasil uji secara keseluruhan menunjukkan penghambatan siklus sel dan induksi apoptosis menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit dan daging kentang hitam mampu menghambat siklus sel, menimbulkan akumulasi sel pada hiperploidi yang selanjutnya akan mengalami apoptosis. Mekanisme kematian kemungkinan melibatkan pula mekanisme kematian lain yang dikenal dengan mitotic catastrophe. Kedua mekanisme kematian tersebut menunjukkan karakteristik terjadinya fragmentasi inti sel.

Beberapa penelitian menunjukkan perlakuan dengan senyawa antimikrotubul memodulasi sel keluar dari fase mitosis tanpa diikuti dengan pemisahan kromosom dan pemisahan sel secara sempurna, hal ini dikenal sebagai kelainan mitosis (aberrant mitotic/ mitotic slippage). Hal ini mengakibatkan sebagian sel yang telah memasuki fase G2-M (4N) tetap melanjutkan siklus selnya dan mengalami endoreduplikasi sehingga menyebabkan sel mengalami hiperploidi.



Akumulasi sel pada G2-M dan "seperti" G1 ini selanjutnya memacu sel untuk mengalami apoptosis. Beberapa peneliti menunjukkan terjadinya kematian sel ditandai dengan hiperploidi dan aktivasi Cdc-2 dikenal sebagai mekanisme kematian mitotic catastrophe, sebagai akibat kelainan mitosis.

## BAB VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Penelitian tahun kedua adalah kelanjutan dari tahun pertama. Dimana tahun pertama tujuan yang akan dicapai telah dapat dicapai. Yaitu mengevaluasi aktivitas anti-proliferasi, apoptosis dan cell cycle arrest ekstrak etanol kulit dan daging kentang hitam. Selanjutnya tahun kedua akan mengevaluasi kemampuannya sebagai antioksidan di tingkat seluler yang dilanjutkan dengan pembuatan produk yaitu effervescent berbasis ekstrak kentang hitam.

Tujuan Hibah Bersaing Tahun Kedua adalah:

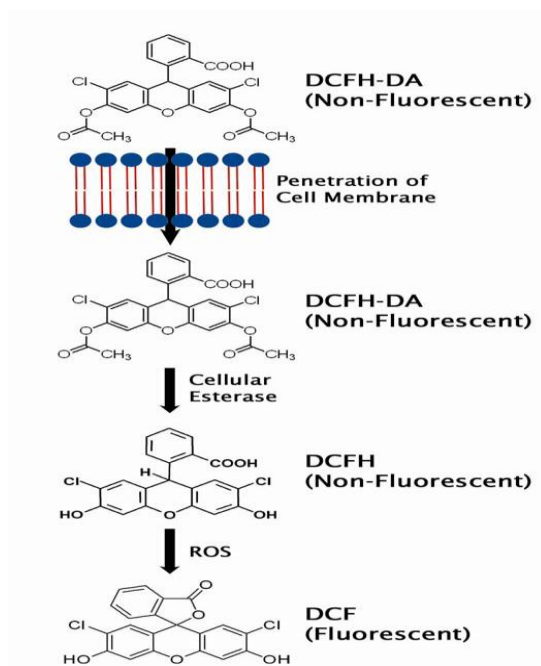
1. Mengetahui kemampuan ekstrak daging dan kulit kentang hitam dalam mereduksi stres oksidatif sel kanker HeLa dan sel kanker T47D yang diinduksi dengan generator radikal (*phorbol miristat asetat*)
2. Pembuatan produk minuman berbasis ekstrak kentang hitam menjadi minuman effervescent dan uji penerimaan konsumen.

### 2. Tahun kedua

#### 2.1. Tahap pertama : Evaluasi aktivitas antioksidan seluler in vitro pada sel kanker MCF-7

Prinsip pengujian aktivitas antioksidan seluler adalah untuk mengukur aktivitas antioksidan pada kultur sel (Kelly L. Wolfe and Rui Hai Liu, 2007; Kelly L. Wolfe et.al, 2008; Kelly L. Wolfe and Rui Hai Liu, 2008). Sel diperlakukan dengan senyawa antioksidan atau ekstrak buah, sayuran dan tanaman yang lain dan DCFH-DA. (2',7'-dichlorofluorescein diacetate). Antioksidan mengikat pada membrane sel dan atau melewati membrane untuk masuk kedalam sel. DCFH-DA berdifusi ke dalam sel dimana esterase seluler melepaskan diacetate sehingga membentuk DCFH yang lebih polar, yang ditrapped dalam sel. Sel yang diperlakukan dengan peroksid radikal, yang dapat berdifusi kedalam sel. ABAB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PMA dan sebagainya secara spontan akan terdekomposisi menjadi pentuk peroksid radikal. Peroksid radikal ini menyerang membrane sel dan menghasilkan lebih banyak radikal dan mengoksidasi DCFH intraseluler DCFH ke bentuk fluorescent DCF. Adanya antioksidan mencegah oksidasi DCFH dan membrane lipida dan menurunkan pembentukan DCF. ( Kelly L. Wolfe and Rui Hai Liu, 2007).

Fluorescent DCF ini dapat diukur dengan fluorescent spectrophotometer, mikroskop fluorescent, dan flow cytometer. Tingkat fluorescent diukur dan proporsional dengan tingkat oksidasi. Senyawa fitokimia murni dan ekstrak buah, sayuran dan tanaman dapat menangkap peroxy radical dan menghambat pembentukan DCF. CAA assay menggunakan kemampuan peroxy radical, produk reaktif dari oksidasi lipida, untuk memicu pembentukan fluoresen oksidatif stress sebagai indikator dalam kultur sel dan mengukur pencegahan oksidasi oleh antioksidan. Perubahan DCFH-DA menjadi bentuk fluorescent (DCF) sehingga dapat ditera dengan fluorescent spectrophotometer, mikroskop fluorescent, dan flow cytometer. Perubahan DCFH-DA menjadi DCF seperti terdapat pada Gambar 13 (Sumber : Cell biolabs, Inc, ROS Assay Kits, 2009)



Gambar 23. Mekanisme pengujian DCF

## 2.2. Langkah penelitian pada tahap pertama :

**Preparasi sample :** Ekstrak kasar bagian kulit, daging umbi

**Evaluasi aktivitas antioksidan seluler (*Cellular Antioxidant Activity/CAA*)**

Penentuan aktivitas antioksidan seluler mengacu pada Wolfe and Liu (2007) and Chang *et al.*, (2001). Sel T47D dan HeLa ditumbuhkan pada DMEM ditambah 10% (v/v) *fetal bovine serum*, 100 U *Penicilin* dan 100mg/ml *Streptomycin*, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Dua puluh empat jam

setelah ditumbuhkan, medium pertumbuhan dibuang dan sumuran dicuci dengan PBS. Tiga sumuran diperlakukan selama 20 menit dengan 100 µl ekstrak kasar etanol kulit dan daging kentang hitam mentah (100, 200, 400 dan 800 µg/ml) dan *quercetin* (10, 20, 40, dan 80 µg/ml). Kemudian ditambah 25 µM DCFH-DA dilarutkan dalam medium perlakuan dan PMA dalam DMSO selama 30 menit. Sel MCF-7 sejumlah 10.000, kemudian ditera dengan *flow cytometer* BD Facs Calibur pada panjang gelombang 535 nm.

Aktivitas antioksidan seluler ditentukan dengan menghitung persentase penurunan ROS yang dimonitoring dengan intensitas fluoresensi :

$$\text{Persentase penurunan ROS} = (\text{Fit}_0 - \text{Fit}_1) \times 100 / (\text{Fit}_0 - \text{Fit}_2)$$

Fit<sub>0</sub>: kontrol dengan stress oksidatif; Fit<sub>1</sub>: sel yang diperlakukan dengan senyawa bioaktif; Fit<sub>2</sub>: kontrol tanpa stress oksidatif (Muanda *et al.*, 2011).

*Quercetin* digunakan sebagai kontrol positif. *Quercetin* sebagai pembanding dalam pengukuran aktivitas antioksidan seluler sesuai dengan Liu and Wolfe (2007): (1) *Quercetin* memiliki aktivitas antioksidan seluler yang tinggi dibandingkan dengan beberapa senyawa fitokimia yang lain; (2) Senyawa murni mudah dan ekonomis; (3) *Quercetin* terdapat pada sebagian besar buah, sayuran dan tanaman yang lain; (4) *Quercetin* relatif stabil.

Penentuan aktivitas antioksidan seluler mengacu pada Kelly wolf and Rui Hai Liu (2007). Sel MCF-7 ditumbuhkan pada DMEM ditambah 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U Penicilin dan 100mg/ml Streptomycin. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Sumuran yang paling luar tidak digunakan karena memberikan lebih banyak variasi dibandingkan bagian dalam. Dua puluh empat jam setelah ditumbuhkan, medium pertumbuhan dihilangkan dan wells dicuci dengan PBS. Tiga wells diperlakukan selama 1 jam dengan ekstrak kasar dan Triterpenic Acid (OA dan UA) 5-40 µg/ml dalam medium pertumbuhan ditambah 25 µM DCFH-DA dilarutkan dalam medium perlakuan. Wells kemudian dicuci dengan 100 µl HBSS. PMA diaplikasikan pada sel dalam 100 µl HBSS selama 1 jam. Sel MCF-7 sejumlah 10.000, kemudian ditera dengan flow cytometer pada panjang gelombang 535 nm. Kontrol: sel yang diperlakukan dengan DCFH-DA dan PMA; blank : sel diperlakukan dengan DCFH-DA dan HBSS tanpa PMA.

## **Tahap kedua**

Pembuatan minuman effervescent berbasis ekstrak etanol kentang hitam dilanjutkan dengan uji penerimaan produk oleh panelis terlatih sebesar 30 orang.

## **BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **Kesimpulan**

1. Sel HeLa lebih sensitif dibandingkan sel T47D dengan perlakuan ekstrak etanol daging dan kulit kentang hitam. Ekstrak etanol kulit kentang hitam memiliki kemampuan lebih besar dalam menghambat proliferasi sel HeLa dan T47D dibandingkan dengan ekstrak etanol daging kentang hitam.
2. Ekstrak etanol daging dan kulit kentang hitam memiliki aktivitas menginduksi apoptosis pada sel HeLa dan T47D
3. Ekstrak etanol daging dan kulit kentang hitam dapat menghambat siklus sel pada S,G2-M serta menginduksi apoptosis pada sub G1

### **Saran**

1. Perlu evaluasi antioksidan seluler untuk mendukung sinergisitas antara aktivitas proliferasi dan antioksidan

## DAFTAR PUSTAKA

- Abcam, 2007, T47D (Human ductal breast epithelial tumor cell line) Whole Cell Lysate (ab14899) datasheet.<http://www.abcam.com/index.html?datasheet=14899>, diakses Februari 2007
- Althunibat, O.Y., Ridzwan, B.H., Taher, M., Daud, J.M., Ikeda, M.A., and Zali B.J., 2009. In Vitro Antioxidant and Antiproliferative activities of Three Malaysian Sea Cucumber Species. *European Journal of Scientific Research*, 37(.3), 376-387.
- Aggarwal, B., and Shishodia, S., 2006. Molecular Target of Dietray Agents for Prevention and Therapy of Cancer. *Biochemical Pharmacology*, 71, 1397-1421.
- Anonim, 2006a, Apoptosis Extrinsic and Intrinsic Pathways, [http://www.upstate.com/features/apop\\_pathway.asp](http://www.upstate.com/features/apop_pathway.asp)
- Anonim, 2006b, Hela Cell, [www.answers.com/topic/hela](http://www.answers.com/topic/hela)
- Anonim, 2006c, Hela is also The German Name for Hel, Poland and The Cruiser SMS Hela,
- Bala Subramanian, Raj Kapoor, Marimuthu, Mohan Sumithra, Jayaraman Anbu, Naranaswamy Harikrishnan, Manavalan Gobinath, Venkatesan Suba, and Ramachandran Balaji., 2007. Biosci, Biotech, Biochem. 71 (9), 2177-2183
- Bharat B. Aggarwal and Shishir Shishodia, 2006. Molecular Target of Dietray Agents for Prevention and Therapy of Cancer. *Biochemical Pharmacology* 71 : 1397-1421.
- Blann, A.D., Byrne, G.J., Baidam, A.D., 2002. Increased soluble intercellular adhesion molecule-1, breast cancer and the acute phase response. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 13(2): 165-168.
- Burdall, E.S., Hanby M.A., Landsdown, R.J.M., dan Speirs, V., 2003, Breast Cancer Cell Line, *Breast Cancer Res.*, 5(2): 89-95.
- Burns, K.M., 2010. Therapeutic foods and nutraceuticals in cancer therapy. *Veterinary Technician*. E1-7.
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sana, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y., 1982. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *Journal of Biological Chemistry*. 257, 7847-7851.
- Catherine W. Lukhoba, Monique S.J. Simmonds, Alan J. Paton., 2006. *Plectranthus* : A review of Ethnobotanical Uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 103 ; 1-24
- Chang, S.T., Wu, J.H., Wang, S.Y., Kang, P.L., Yang, N.S., and Shyur, L.F., 2001. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* Bark and heartwood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3420-3424.

- Chen, G.Q., Yao, Z.W., Zheng, W.P., Chen, L., Duan, H., and She, Y., 2010. Combined Antitumor Effect of Ursolic Acid And 5-Fluorouracil on Human Esophageal Carcinoma Cell Eca-109 *In Vitro*. *Chinese Journal of Cancer Research*, 22(1), 62-67.
- Crespo, I., Garcia-Mediavilla, M.V., Gutierrez, B., Sanchez-Campos, S., Tunon, M.J. and Gonzalez-Gallego, J., 2008. A comparison of the effects of kaempferol and quercetin on cytokine-induced pro-inflammatory status of cultured human endothelial cells. *British Journal of Nutrition*, 100, 968–976.
- Du.H and Chen X.Q., 2009. A Comparative Study of The separation of Oleanolic acid and Ursolic Acid in *Prunella vulgaris* by High Performance Liquid Chromatography and Cyclodextrin-Modifies Micellar Elektirikinetik Chromatography. *J. Brazil Chem.*, Vol. 19 No.7, 1429-1432.
- Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., and Liang, J., 2005. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11): 719–727.
- Freshney, R.I., 1986, *Animal Cell Culture, A Practical Approach*, 1st Ed, IRL Press, Washington D.C.
- Gabor Janicsak, Katami Veres, Andras Zoltan Kakasy and Imre Mathe., 2006. Study of Oleanolic and Ursolic Acid Contents of Some Species of The Lamiceae. *Bochemical Systematic and Ecology*, 34, 392-396.
- Gebhardt, R., 2003. Antioxidative, Antiproliferative and biochemical effects in HepG2 cells of a homeopathic remedy and its constituent plant tinctures tested separately or in combination. *Drug Research*, 53,No.12, 823-830.
- Gibellini, L., Pinti, M., Nasi, M., Biasi, S.D., Roat, E., Bertoncelli, L., Cossarizza, A., 2010. Interfering with ROS metabolism in cancer cells: the potential role of quercetin. *Cancers*, 2, 1288-1311.
- Gina Manda, Marina Tamara nechifor and teodora-Monica Neagu., 2009. Reactive Oxygen species, cancer and Anti-Cancer Therapies. *Current Chemical Biology*, 3, 22-46.
- Godevac, D., Vujisic, L., Mojovic, M., Ignjatovic, A., Spasojevic, I., Vajs, V., 2008. Evaluation of antioxidant capacity of *Allium ursinum* L. volatile oil and its effect on membran fluidity. *Food Chemistry*, 107: 1692–1700
- Gohari AR, Saeidnia S, Hadjiakhoondi A, Abdoullahi M, Nezafati M., 2009. Isolation and Quantificative Analysis of Oleanolic Acid from *Satureja mutica* Fisch. & C. A. Mey. *Journal of Medicinal Plans*, Volume 8,Supplement No. 5, Winter 2009
- Goodwin, E.C., DiMaio, D., 2000, Repression of human papillomavirus oncogenes in Hela cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways, *Biochemistry*, Vol.97, no.23.
- Hendrich, A., 2006. Flavonoid-membran interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27 (1): 27–40

- Hogan. S., Chung, H., Zhang, L., Li, J., Lee, Y.W., Yumin and Zhou, K., 2010. Antiproliferative and Antioxidant Properties of Antocyanin-rich extract from Acai. *Food Chemistry*, 118, 208-214.
- Hyungeun Yoon, and Rui Hai Liu., 2008. Effect of 2  $\alpha$ -hydroxyursolic acid on NF- $\kappa$ B activation induced by TNF- $\alpha$  in Human Breast Cancer MCF-7 cells. *J. Agric. Food Chem.* 56, 8412-8417.
- Jie Lie, Wei-Jian Guo, Qing-Yao Yang., 2002. Effect of Ursolic Acid and Oleanolic Acid on Human Colon Carcinoma Cell Line HCT 15. *World J. gastroenterol.* 8 (3) : 493-495.
- Ju-Hong Feng, Wei Chen, Yu Zhao and Xiu-Lian Ju., 2009. Anti-Tumor Activity of Oleanolic, Ursolic and Glycyrrhetic Acid. *3The Open Natural Products Journal*, 2009, 2, 48-52
- Kim, D.Y., Baek, J.H., Kang, C.M., Yoo, M.A., Sung, J.W., Kim, D.K, Chung, H.Y., Kim, N.D., Choi, Y.H., Lee, S.H., and Kim, K.W., 2000. Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication. *International Journal of Cancer*, 87(5), 629-636.
- Kosior wojciak., 2007. Separation and Determination of Closely Related Triterpenic Acid by High-Performance Thin –Layer Chromathography After Iodine Derivatization. *Jornal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis*, 45, 337-340
- Kuhar, M., Imran, S, and Singh, N., 2007. Curcumin and Quercetin Combined with Cisplatin to Induce Apoptosis in Human Laryngeal Carcinoma Hep-2 Cells through the Mitochondrial Pathway. *Journal of Cancer Molecules*,
- Kumala, S., Meiyanto, E.,Muthi'ikawati, Jenie, R.I., 2010. Sinergisme fraksi butanol metabolit sekunder kapang endofit 1.3.11 dengan doxorubicin dalam modulasi daur sel T47D dan MCF-7.
- Labwork Study Guideand Lecture Notes, 2000, Henrietta Lacks, [www.micro.msb.le.ac.uk/Labwork/Lack1.htm](http://www.micro.msb.le.ac.uk/Labwork/Lack1.htm).
- Lee, D.F., and Hung, M.C., 2008. Advances in Targeting IKK and IKK-Related Kinases for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 14: 5656.
- Lien Ai Pham-Huy, Hua He and Chuong Pham-Huy., 2008. Free radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science* vol 4 N0 2 june 2008
- Li, Y., Xing, D., Chen, Q., and Chen, W.R., 2010. Enhancement of chemotherapeutic agent-induced apoptosis by inhibition of NF- $\kappa$ B using ursolic acid. *International Journal of Cancer*, 127(2), 462–473.
- Liu, Y.Z., Chen, B., and She, X.D., 1998. A clinical evaluation of serum concentrations of intercellular adhesion molecule-1 in patients with gastric cancer. *The World Journal of Gastroenterology*, 4(3): 225-227.



- Liu, R.H., and Finley, J., 2005. Potential cell culture models for antioxidant research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4311-4314.
- Luisa Pistelli., 2006. Phytochemicals from lamiaceae : From Nutraceuticals to Hallucinogens. International Symposium The Labiate. Advances in Production, Biotechnology and Utilization. 22 – 25 February 2006. Saremo, Italy.
- Mackay, H.J., and Twelves, C.J., 2003. Protein kinase C: a target for anticancer drugs?. *Endocrine-Related Cancer*, 10, 389-396.
- Manu, K.A., and Kuttan, G., 2008. Ursolic acid induces apoptosis by activating p53 and caspase-3 gene expressions and suppressing NF- $\kappa$ B mediated activation of bcl-2 in B16F-10 melanoma cells. *International Immunopharmacology*, 8(7), 974-981.
- Manda, G., Nechifor, M.T., and Neagu, T.M., 2009. Reactive Oxygen species, cancer and Anti-Cancer Therapies. *Current Chemical Biology*, 3, 22-46.
- Martin, K.R., 2006. Targeting apoptosis with dietary bioactive agents. *Experimental Biology and Medicine*, 231, 117-129.
- Mathe Imre, 2008. Some Aspect of Chemical Diversity of Lamiaceae Species.,
- Michael M. Opta and Ernest B. Izevbigie, 2006. Aqueous Vernonia amigdalina extracts alter MCF-7 cell membrane permeability and efflux. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 3(2), 174-179.
- Min Yang, Xiaoming Wang, Shuhong Guan and Jiameng Xia., 2007. Analysis of triterpenoids in Ganoderma Lucidum using Liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. American Society for Mass Spectrometry.
- Mooi, A.M. Ali, A.B. Norhanom, K. Mat Salleh, A. Murakami and K. Koshimizu., 1999. Anti-Tumor Promoting Activity of Some Malaysian Traditional vegetables (Ulam). *Natural Product Sciences* 5(1) : 33-38.
- Moongkarndi, P., Kosema, N., Kaslungka, S., Luanratana, O., Pongpan, N., and Neungton, N., 2004. Antiproliferative, antioxidant and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 161-166.
- Murakami A, Hajme, O., and Koichi, K., 1996. Anti-tumor Promotion with Food Phytochemicals: A Strategy for Cancer Chemoprevention. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60 (1), 1-8.
- Osama, Y.A., Ridzwan Bin Hashim, Taher, M., Daud, J.M., Ikeda, M.S., Zali, B.J., 2009. In Vitro Antioxidant and Antiproliferative activities of Three Malaysian Sea Cucumber Species. *European Journal of Scientific Research*. ISSN 1450-216X. Vol. 37.No.3, pp. 376-387.

- O'Sullivan, A.M., O'Callaghan, Y.C., O'Grady, M.N., Queguineur, B., Hanniffy, D., Troy, D.J., Kerry, J.P., O'Brien, N.M., 2011. In vitro and cellular antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland. *Food Chemistry*, 126:1064-1070.
- Pandey, M., and Vijayakumar., 2011. Nutraceutical supplementation for diabetes: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol 3, Suppl 4: 33-40.
- Pastre, D., Pietrement, O., Zozime, A., Le Cam, E., 2005. Study of the DNA/ethidium bromide interactions on mica surface by atomic force microscope: influence of the surface friction. *Biopolymer*, 77, 53-62.
- Pecorino, L., 2008. *Molecular Biology of Cancer. Mechanism, Target, and Therapeutics*. Second edition, Oxford University Press.
- Pilati, P., Rossi, C.R., and Mocellin, S., 2008. Strategies to enhance the anticancer potential of TNF. *Frontier in Bioscience*, 13: 3181-3193.
- Pitot, H.C., and Dragon, Y.P., 1991. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, J.5, 2280-2286.
- Prades, J., Vogler, O., Alemany, R., Gomez-Florit, M., Funari, S.S., Ruiz-Guiterrez, V., and Barcelo, F., 2011. Plant triterpenic acid as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808: 752-760.
- Rackley, J.D., Clark, P.E., Hall, H.C. Lycopene, Silbinin, Shark cartilage, vitamin D, vitamin D to decrease osteoporosis and bone pain, green tea, selenium, and vitamin E, grape seed extract, modified citrus, pectin, soy. PC-SPES are cited as prostate cancer protective food supplements. *Urol Clin North Am*: 33(2): 237-46
- Rebecca S., Matthew B., Amanda P., Christopher W and Barbara B., 2003. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer :Insights from the MCF-7 cell model system. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 228(9), 995-1003.
- Russo, S., Cardile, V., Loannes A., Garbarino, J., 2009. Effect of luteol on the viability of human cancer cells. *Chemico-Biology Interactions*, 179, 178-184.
- Schafer, J.M., Lee, E.S., O'Regan, R.M., Yao, K., and Jordan, V.C., 2000, Rapid Development of Tamoxifen-stimulated Mutant p53 Breast Tumors (T47D) in Athymic Mice, *Clinical Cancer Research*, 6, 4373-4380
- Shaban A., Jahanmehr, S.A., Rezaeeian, M., Einolahi, N., Arjomand, A., Monsefesehani H.R., Kazemi V., and Akrami M., 2007. Fenugreek (*Trigonella Foenum Graecum* L.) seed extract induces cell death. Growth inhibition and morphological change indicative of apoptosis in acute lymphoblastic leukemia. *Research Journal of Biological Sciences*, 2 (4), 438-443.

- Shan, J.Z., Xuan, Y.Y., Zheng, S., Dong, Q, and Zhang, S.Z., 2009. *Ursolic acid* inhibits proliferation and induces apoptosis of HT-29 colon cancer cells by inhibiting the EGFR/MAPK pathway. *Journals of Zhejiang University-Science B*, 10(9), 668-674.
- Sharma R., 2009. Nutraceuticals and nutraceutical supplementation criteria in cancer: A literature survey. *The Open Nutraceuticals Journal*, 2: 92-106.
- Shyu, M.H, Kao, T.C, and Y, G.C., 2010. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in HuH7 human hepatocellular carcinoma cells through a mitochondrial-dependent pathway and downregulation of XIAP. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (10), 6110-6118.
- Shi, M., Cai, Q., Yao, L., Mao, Y., Ming, Y., Ouyang, G., 2006. Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells. *Cell Biology International*, 30, 221-226.
- Sidi, Y., Yakobson, E., Vestin, A., Sergeyev, V., Khazanov, E., and Barenholz, Y., 2006. Bcl 2 and Bcl-xL are candidate targets for growth inhibition of breast cancer cells using siRNA lipoplexes. *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volume 47.
- Srisala, S., Chunhabudnit, R., Kongkachuichal, R., Jittorntrum, B., visetpanit, Y., 2009. Effects of bran extracts from thai molecular breeding rices on growth and apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. *Thailand Journal Toxicology*, 24(2), 81-91.
- Tsuchiya, H., 2010. Structure-dependent membran interaction of flavonoids associated with their bioactivity cancer chemoprevention. *Food Chemistry*, 120: 1089–1096
- Verma, S.P., Goldin, B.R., and Lin, P.S., 1998, The Inhibition of the Estrogenic Effects of Pesticides dan Enviromental Chemicals by Curcumin and Isoflavonoids, *Envir. Health Presp*, 106 (12), 807-812.
- Wang, G.Y., Ji, B., Wang, X., and Gu, J.H., 2005. Anti-cancer effect of iNOS inhibitor and its correlation with angiogenesis in gastric cancer. *World Journal of Gastroenterol*, 11(25):3830-3833.
- Wolfe, K., Kang, X., He, X., Dong, M., Zhang, Q., and Liu, R.H., 2008. Cellular antioxidant activity of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8418-8426.
- Wolfe, K., and Liu, R.H., 2008. Structure-Activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8404-8411.
- Wolfe, K., and Liu, R.H., 2007. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8896-8907.

[www.Prota.org](http://www.Prota.org). *Solenostemon rotundifolius* (Poir) J.K. Morton. Author : G.O. Nkansah  
Faculty of agriculture, ARS-KADE, University of Ghana (Legon), P.O. Box 55, Accra  
(Legon) Ghana

Yap Wei Hsum, Wong Teck Yew, Paul Lim Vey Hong, Khoo Kong Soo, Lim Saw Hoon, Yeo Chew Chieng, Lim Yang Moo., 2008. *Identificaton and evalusation of potential anti-tumor promoting compounds from tubers of coleus tuberosus*. International PSE Symposium On Natural Products in cancer Therapy. 23-26 September 2008. Naples Italy.

Yan-Xia, Y., Zhen-lun, G., Jiang-lin, Y., Wen-hsien, C., Chi-yi., K., Zheng-hong, Q., and Zhong-qin, L., 2010. Ursolic acid induces human hepatoma cell line SMMC-7721 apoptosis via p53-dependent pathway. *Chinese Medical Journal*, 123(14), 1915-1923.

Yosra Allouche, Antonio Jimenez, Marino Uceda, Paz Aguilera, Jose Juan Gaforio and Gabriel Beltran., 2010. Influence of olive paste preparation condition on virgin oil triterpenic compound at laboratory-scale. *Food Chemistry* 119 (2010) 765-769.

Zampieri, L., Bianchi, P., Ruff, P., dan Arbuthnot, P., 2002, Differential modulation by estradiol of P-glycoprotein drug resistance protein expression in cultured MCF7 and T47D breast cancer cells, *Anticancer Res.*, 22(4):2253-9.

Zhang, P., Li, H., Chen, D., Ni, J., Kang, Y., and Wang, S., 2007. Oleanolic acid Induced Apoptosisin Human leukemia Cells Through Caspase Activation and Poly (ADP-ribose) Polymerase Cleavage. *Acta Biochemica et biophysica Sinica*, 39 (10) 803-809.

## DATA PRIBADI

1.	Nama Lengkap (dengan gelar)	Dr. Mutiara Nugraheni, S.TP., M.Si
2.	Jabatan Fungsional	Lektor Kepala
3.	Jabatan struktural	-
4.	NIP	19770131 200212 2 001
5.	NIDN	0031017705
6.	Tempat dan Tanggal Lahir	Bantul dan 31 Januari 1977
7.	Alamat Rumah	Wiyoro Lor No. 14 Baturateno Banguntapan Bantul 55197 Yogyakarta
8.	Nomor Telepon/HP	(0274) 383 288 / 081578740391
9.	Alamat Kantor	Jurusan Pendidikan Teknik BOga dan Busana, Fakultas Teknik Universitas Negeri Yogyakarta, Karangmalang Depok Sleman
10.	Nomor Telepon	0274
11.	Alamat email	<a href="mailto:mutiara_nugraheni@yahoo.com">mutiara_nugraheni@yahoo.com</a>
12.	Lulusan yang telah dihasilkan	S1=20 orang
13.	Mata Kuliah Yang diampu	1. Ilmu Pangan 2. Teknologi Pengawetan makanan 3. Pengetahuan Bahan Pangan 4. Pengujian Mutu Pangan 5. Pengendalian Mutu Pangan 6. Manajemen Usaha Boga 7. Manajemen Katering 8. Pengembangan Bisnis Waralaba

### 1. RIWAYAT PENDIDIKAN

a. Program	S1	S2	S3
Nama PT	UGM	UGM	UGM
Bidang Ilmu	Teknologi Hasil Pertanian (Ilmu dan teknologi Pangan)	Magister Manajemen Agribisnis	Ilmu Pangan
Tahun Masuk - lulus	1995- 1999	1999 - 2001	2008 - 2011
Judul Skripsi/Tesis/Disertasi	Makanan tradisional kudapan bagi anak-anak dan ibu hamil di wilayah Daerah Istimewa Yogyakarta	Analisis Faktor-faktor yang mempengaruhi efisiensi produksi di Koperasi Susu Warga Mulya Sleman Yogyakarta	Potensi Ekstrak Kentang Hitam ( <i>Coleus tuberosus</i> ) Sebagai antioksidan dan antiproliferasi sel kanker payudara (MCF-7) <i>in vitro</i>
Nama Pembimbing/Promotor	Dr. Suparmo, M.Sc	Prof. Dr. Ir. Irham, M.Sc	Prof. Dr. Ir. Umar Santoso, M.Sc Dr. Suparmo, M.Sc. Prof. drh. Hastari Wuryastuti, M.Sc., Ph.D

## II. PENGALAMAN PENELITIAN

No.	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan	
			Sumber	Jumlah (juta Rp)
1.	2006	Pengaruh Penggunaan Variasi Sumber Nitrogen pada Pemanfaatan Limbah Tahu Terhadap Karakteristik Nata de Soya Mentah dan Limbahnya	Dosen Muda	9.4
2.	2007	Potensi Kentang Hitam/Kentang Kleci ( <i>Solenostemon Rotundifolius</i> ) sebagai Makanan Fungsional	DIK's UNY	6
3.	2008	Pengaruh kombinasi bahan baku dan lama fermentasi tahap II pada pemanfaatan limbah tahu terhadap karakteristik kecap ampas tahu	Dosen Muda	9.8
4.	2008	Kajian Tempe Kacang Tolo sebagai Sumber Isoflavon yang berpotensi sebagai Makanan Fungsional	Hibah Bersaing ANGGOTA	45
5.	2009	Kajian Tempe Kacang Tolo sebagai Sumber Isoflavon yang berpotensi sebagai Makanan Fungsional	Hibah Bersaing ANGGOTA	40
6.	2009	Kajian kentang hitam ( <i>Coleus tuberosus</i> ) sebagai Sumber Antioksidan Aalami dan <i>Resistant starch</i> yang berpotensi sebagai Makanan Fungsional	Hibah Kompetitif Strategis Nasional KETUA	93
7.	2010	Kajian kentang hitam ( <i>Coleus tuberosus</i> ) sebagai Sumber Antioksidan Aalami dan <i>Resistant starch</i> yang berpotensi sebagai Makanan Fungsional	Hibah Kompetitif Strategis Nasional KETUA	88
8.	2010	Aktivitas antioksidan seluler dan antiproliferasi triterpenic acid dari kentang hitam ( <i>Coleus tuberosus</i> ) pada sel kanker payudara	Hibah Disertasi Doktor KETUA	33.95

### III. PENGALAMAN PENGABDIAAN MASYARAKAT

No.	Tahun	Judul Pengabdian Kepada Masyarakat	Pendanaan	
			Sumber	Jumlah (juta Rp)
1.	2006	Pelatihan penanganan dan pengolahan ikan di desa Pucung kecamatan Sadeng Gunung Kidul	Sibermas (DIKTI)	10
2.	2007	Peningkatan Kapasitas dan Kualitas Produksi Cabai Merah Kering dengan Alat Pengereng Sederhana di Industri Pangan Rumah Tangga (IPRT) Satrio Buwono Kecamatan Sanden Kabupaten Bantul	Vucer (DIKTI)	15
3.	2007	Teknologi pengawetan cabai merah sebagai upaya meningkatkan kesejahteraan petani di kecamatan galur, kabupaten kulon progo Yogyakarta	PPM Reguler UNY	7.5
4.	2007	Teknologi pengawetan bawang merah dengan penuntasan minyak sistem sentrifugasi Sebagai alternatif penanganan pasca panen Di kecamatan galur, kabupaten kulon progo, Yogyakarta	PPM Reguler UNY	7.5
5.	2008	Pemanfaatan ampas tahu menjadi kecap sebagai upaya pengembangan usaha kecil dan menengah	PPM Reguler UNY	7.5
6.	2009	Teknologi Pengawetan Buah Melon Sebagai Upaya Peningkatan Nilai Guna dan Nilai Ekonomi Bagi Petani Melon	PPM Reguler UNY (DIPA UNY)	7.5
7.	2010	IbM KSM Mekar Sari untuk Diversifikasi Produk Umbi Ganyong sebagai Upaya Peningkatan Ketahanan Pangan Berbasis Umbi umbian Lokal di Kabupaten Kulon Progo, DIY	Ibm (DP2M)	35
8.	2010	Penguatan usaha dan perluasan pemasaran peyek Imogiri Bantul Yogyakarta	Ibm (DP2M)	35
9.	2010	Memberikan ceramah dengan judul: Perkembangan makanan dan fungsinya	POTM SDIT Salsabila Al-Muthi'in	
10.	2011	Teknologi Pengolahan Tepung Sukun sebagai Upaya Pemberdayaan Wanita Pedesaan untuk Meningkatkan Ketahanan Pangan	PPM Unggulan UNY (DIPA UNY)	15
11.	2011	Memberikan ceramah dengan judul: Makanan halal dan thoyib	POTM SDIT Salsabila Al- Muthi'in	

#### IV. PENGALAMAN PENULISAN ARTIKEL ILMIAH DALAM JURNAL

No.	Tahun	Judul Artikel Ilmiah	Volume/Nomor	Nama Jurnal
1.	2005	Potensi fungsional bubuk buah kesemek ( <i>Dyospirus kaki</i> )		JPTK Universitas Negeri Malang (Terakreditasi)
2.	2005	Aktivitas antioksidan bubuk buah kesemek ( <i>Dyospirus kaki</i> )		Saintek UNY
3.	2005	Susu Kedelai, alternatif pemasok protein		Wuny UNY
4.	2006	Diversifikasi pengolahan cabai merah sebagai usaha penanganan melimpahnya produksi cabai merah		INOTEKS UNY
5.	2006	Pembuatan nugget dan kerupuk ikan pada masyarakat sekitar pantai Pandansimo		INOTEKS UNY
6.	2008	Pengaruh ekstrak kecambah kacang hijau sebagai sumber nitrogen pada pemanfaatan limbah tahu terhadap karakteristik nata de soya mentah dan limbahnya		Tekna Universitas Negeri Malang (Terakreditasi I)
7.	2009	Kajian tempe kacang tolo sebagai sumber isoflavin		Saintek UNY
8.	2011	In vitro antioxidant, antiproliferative and apoptosis effect of <i>Coleus tuberosus</i> L.	Vol. 5(4), pp 232-241, April 2011	<i>African Journal Food Science</i>
9.	2011	Potential of <i>Coleus tuberosus</i> as an antioxidant and cancer chemoprevention agent	Volume 18 Issue 4, 2011	<i>International Food Research Journal (IFRJ)</i> ,
10.	2012	Cellular antioxidant and antiproliferative activity of ethanolic extract of <i>Coleus tuberosus</i>		<i>Journal of Medicinal Plants Research</i> (Accepted for publication)
12.		Effect of <i>Coleus tuberosus</i> consumption on Lipoprotein profile on Alloxan-Induced Diabetic Rats		Submit to <i>International Food Research Journal</i>



**Penyampaian Makalah secara Oral pada pertemuan/seminar ilmiah dalam 5 tahun terakhir**

No.	Nama Pertemuan Ilmiah/ Seminar	Judul Artikel Ilmiah	Waktu dan tempat
1.	Seminar nasional Mindset Revolution: mengubah pola pikir untuk bekerja sama dengan lingkungan		6 Februari 2010
2.	Seminar nasional Mindset Revolution: mengubah pola pikir untuk bekerja sama dengan lingkungan		6 Februari 2010
3.	International seminar Emerging issues and technology developments in foods and ingredients	Triterpenic Acid Content And Antioxidant Activity Of Ethanollic Extract Of <i>Coleus Tuberosus</i>	September ,29-30 <sup>th</sup> 2010
4.	Seminar nasional Character Building for Vocational Education	Potensi kentang hitam pada pencegahan penyakit akibat stres oksidatif	5 desember 2010
5.	Seminar Nasional wonderful Indonesia	Potensi kulit buah dan sayuran sebagai sumber senyawa bioaktif pencegah penyakit degeneratif	3 Desember 2011
6.	Seminar Nasional wonderful Indonesia	Potensi Makanan fermentasi sebagai makanan fungsional	3 Desember 2011

**Pengalaman Penulisan Buku dalam 5 tahun terakhir**

No.	Judul Buku	Tahun	Jumlah halaman	Penerbit
1.	Eco-efisiensi pada Katering	2010	110	GTZ dan Badan Lingkungan Hidup Yogyakarta

**Pengalaman perolehan HKI dalam 5-10 tahun terakhir**

No.	Judul/Tema HKI	Tahun	Jenis	Nomor P/ID
1.	Pendaftaran Paten dengan judul: Metode ekstraksi kentang hitam ( <i>Coleus tuberosus</i> ) dan penggunaannya sebagai pereduksi stres oksidatif. (Dipilih Dikti pada acara pemanfaatan hasil penelitian untuk paten di Semarang)	2011	Paten Sederhana	No pendaftaran: P00201100718

**Penghargaan yang pernah diraih dalam 10 tahun terakhir (dari pemerintah, asosiasi atau institusi yang lain)**

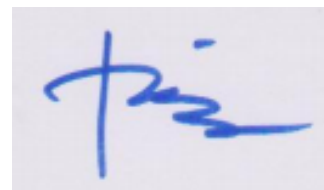
No.	Jenis Penghargaan	Institusi Pemberi Penghargaan	Tahun
1.	Presenter terbaik pada seminar hasil program penerapan Ipteks kepada Masyarakat dan Industri Rumah Tangga di Perguruan Tinggi Tahun 2007	Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional	22 s.d. 24 Mei 2008

Semua data yang saya isikan dan tercantum dalam biodata ini adalah benar dan dapat dipertanggungjawabkan secara hukum. Apabila di kemudian hari ternyata dijumpai ketidaksesuaian dengan kenyataan, saya sanggup menerima resiko.

Demikian biodata ini saya buat dengan sebenarnya untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam pengajuan Hibah Penelitian Bersaing

Yogyakarta, November 2013

Pengusul,



Dr. Mutiara Nugraheni, S.TP., M.Si.

## IDENTITAS DIRI

1.	Nama Lengkap (dengan gelar)	dr. Windarwati, Sp.PK (K)., M.Sc.
2.	Jabatan Fungsional	Dokter Pendidik Klinis
3.	Jabatan struktural	Penanggung jawab SDM
4.	NIP	19660521 199503 2 001
5.	NIDN	0921056601
6.	Tempat dan Tanggal Lahir	Bantul, 21 Mei 1966
7.	Alamat Rumah	Wiyoro Baturetno Banguntapan Bantul
8.	Nomor Telepon/HP	0274 4435507 / 081524261861
9.	Alamat Kantor	RSUP Dr. Sardjito dan FK UGM
10.	Nomor Telepon	0274 518687
11.	Alamat email	
12.	Lulusan yang telah dihasilkan	15
13.	Mata Kuliah Yang diampu	1. Pathologi Klinik
		2. Metabolik endokrin
		1. Kesehatan dan keselamatan kerja laboratorium
		2. Mutu laboratorium

## 2. RIWAYAT PENDIDIKAN

a. Program	S1	S2	S3
Nama PT	UGM	UGM	
Bidang Ilmu	Kedokteran Umum	IKK	
Tahun Masuk - lulus	1984-1990	2008-2011	
Judul Skripsi/Tesis/Disertasi		Sindrom metabolic shift perawat regular di RSUP Dr. Sardjito	
Nama Pembimbing/Promotor		Prof. dr. Budi Mulyono, Sp.PK (K), MM Dr. Yusrizal Jam'an, Sp.P	

### 3. PENGALAMAN PENELITIAN

No.	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan	
			Sumber	Jumlah (juta Rp)
1.	2009	Hubungan Kadar <i>C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen</i> (CTX) serum dengan Skor <i>Bone Mineral Density</i> pada Wanita Perimenopause dan postmenopause	Departemen kesehatan	30
2.	2010	Hubungan antara kadar osteocalcin serum dengan bone mineral density pada wanita perimenopause dan postmenopause	FK UGM	30
3	2010	Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) serum sebagai marker deteksi dini pada acute kidney injury	Departemen kesehatan	25
4.	2011	Kadar D-Dimer >500 ng/ml Sebagai Faktor Prognosis Luaran Klinis Pada Stroke Infark	FK UGM	30
5.	2011	Penampilan Diagnostik Hemoglobin A1c Untuk Diagnosis Diabetes Melitus Tipe 2 Pada Populasi Dengan Faktor Risiko	FK UGM	30
6.	2011	Hubungan antara resistensi insulin dan hipertensi	FK UGM	30

### 4. PENGALAMAN PENGABDIAN MASYARAKAT

No.	Tahun	Judul Pengabdian Kepada Masyarakat	Pendanaan	
			Sumber	Jumlah (juta Rp)
1.	2007	Pembicara pada: laboratorium skrining hipotiroid konginental	Dinas kesehatan	
2.	2008	Pembicara pada acara pembinaan hipotiroid konginental popinsi DIY	Dinas kesehatan	
3.	2009	Pembicara pada acara pembinaan hipotiroid konginental popinsi DIY	Dinas kesehatan	
4.	2010	Pembicara pada acara pembinaan hipotiroid konginental popinsi DIY	FK UGM	

## 5. PENGALAMAN PENULISAN ARTIKEL ILMIAH DALAM JURNAL

No.	Tahun	Judul Artikel Ilmiah	Volume/Nomor	Nama Jurnal
1.	2010	Relevance of uric Acid in Progression of Type 2 Diabetes Mellitus		
2.	2010	Change in the Distribution of Albuminuria According to Estimated Glomerular Filtration Rate in prima Indians with Type 2 Diabetes		
3.	2010	Endogenous Sex Hormone and Glucose Tolerance Status in Postmenopausal Women		
4.	2011	Obesity related lipid profile and altered insulin increton in adolescents with polycystic ovary syndrome		
5.	2011	Appropriate cut-off value for follicle-stimulating hormone in a zoospermia to predict spermatogenesis		

## 6. Penyampaian Makalah secara Oral pada pertemuan/seminar ilmiah dalam 5 tahun terakhir

No.	Nama Pertemuan Ilmiah/ Seminar	Judul Artikel Ilmiah	Waktu dan tempat
1.	Seminar Nasional Pathologi Klinik 2010	Konversi Pemeriksaan Albumin Metode <i>Bromcresol Green (BCG)</i> dan <i>Bromcresol Purple (BCP)</i> Pada Pasien Hipoalbuminunemia	
2.	Seminar nasional patologi klinik 2010	Profil Albumin dan glukosa darah sewaktu pada pasien luka bakar korban erupsi gunung merapi	
3.	PIT Pendidikan Dokter Spesialis Patklin	Pemeriksaan laboratorium pada infertilitas	Solo 2010
4.	PIT Pendidikan Dokter Spesialis Patklin	Kesehatan dan keselamatan kerja, sindrom metabolik	Solo, 2011
5.	HKKI	Pemeriksaan laboratorium pada osteoporosis	Yogyakarta, 2011

## 7. Pengalaman Penulisan Buku dalam 5 tahun terakhir

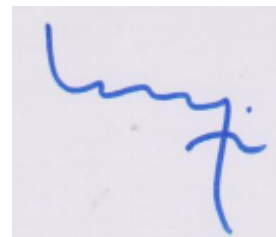
No.	Judul Buku	Tahun	Jumlah halaman	Penerbit
1.	Pemantapan mutu internal	2011	130	
2.	Laboratorium klinis	2011	200	

Semua data yang saya isikan dan tercantum dalam biodata ini adalah benar dan dapat dipertanggungjawabkan secara hukum. Apabila di kemudian hari ternyata dijumpai ketidaksesuaian dengan kenyataan, saya sanggup menerima resiko.

Demikian biodata ini saya buat dengan sebenarnya untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam pengajuan Hibah Penelitian Bersaing

Yogyakarta, November 2013

Pengusul,



Dr. Windarwati, Sp.PK (K)., M.Sc.

## BIODATA Anggota

1. Nama Lengkap : Badraningsih Lastariwati
2. Tempat dan tanggal lahir : Yogyakarta, 25 Juni 1960
3. Program studi / PT : Pendidikan Teknologi Kejuruan / UNY
4. Alamat surat : Jurusan Pendidikan Teknik Tata Boga & Busana,  
FT UNY Karangmalang, Yogyakarta.
  - Telepon : 0274-516714
  - e-mail : [badraningsih@yahoo.co.id](mailto:badraningsih@yahoo.co.id)
5. Status Akademik : Mahasiswa S3
6. Jabatan Struktural : -
7. Pendidikan Terakhir : M.Kes., 1997, Program Studi Perilaku & Promosi  
Kesehatan Ilmu Kesehatan Masyarakat, FK UGM

### 8. Pengalaman Penelitian :

No.	Judul	Tahun, Sumber Dana
1	<i>Brownies Puree Ubi Jalar Putih Sebagai Produk Unggulan Potensial Makanan Fungsional (Ketua)</i>	2006, PHK A3
2	<i>Penerapan Model Pembelajaran Kreatif Produktif Pada Pembelajaran Seni Penyajian Makanan (Ketua)</i>	2007, DIKTI
3	<i>Need Assesment Method Sebagai Tindak Lanjut Pembinaan Profesi Guru (Anggota)</i>	2008. LEMLIT UNY
4	<i>Kewirausahaan &amp; Minat Usaha Pada Siswa SMK Negeri Yogyakarta (Pembimbing)</i>	2009, MANDIRI
5	<i>Pelaksanaan Pembelajaran Kewirausahaan Bagi Remaja Putri Di Pondok Pesantren Ta`Mirul Islam Surakarta (Pembimbing)</i>	2009/2010, MANDIRI

### 9. Publikasi Ilmiah :

No.	Judul	Tahun	Tempat Publikasi
1	<i>Pengaruh penggunaan lemak pada kualitas produk kue tradisional bakpia</i>	2005	Seminar Nasional “Membangun Citra Pangan Tradisional” (ISBN 979-9579-58-9); FT Unes, Semarang

No.	Judul	Tahun	Tempat Publikasi
2	<i>Hubungan antara pengetahuan &amp; konsumsi makanan &amp; minuman instan dengan status gizi remaja putrid</i>	2006	Berita Kesehatan Masyarakat (BKM) Vol 22 (1) : 24-32 (ISBN 0215-1936); FK UGM, Yogyakarta (Terakreditasi)
3	<i>Implementasi model pembelajaran Kreatif Produktif Pada Pembelajaran Seni Penyajian Makanan</i>	2008	Prosiding Seminar Nasional Penelitian Studi Kajian Wanita Tahun 2007 (ISBN 978-979-562-019-8); Lemlit UNY, Yogyakarta
4	<i>Need Assesment Method Sebagai Tindak Lanjut Pembinaan Profesi Guru</i>	2008	Seminar Internasional “Revitalisasi Pendidikan Kejuruan Dalam Pengembangan SDM Nasional”; APTEKINDO, Padang
5	<i>Pentingnya Kelas Kewirausahaan pada SMK Pariwisata</i>	2012	Journal Pendidikan Vokasi. Vol.2, No.1 (ISSN:2088-2866)
6	<i>Redesign of Vocational Education in Indonesia as a Discourse in the Future</i>	2012	Proceeding International Conference on Vocational Education and Training (ICVET 2012) YSU, Indonesia
7	<i>Perilaku Wirausaha Siswa Pada penerapan model pembelajaran Kewirausahaan Produktif untuk SMK Tata Boga</i>	2013	Proceeding Optimalisasi Penelitian dan PPM untuk perencanaan dan kemandirian bangsa, UNY, 2013

Yogyakarta, Nopember 2013



Badraningsih Lastariwati